

Aus der Medizinischen Klinik III
der Ludwig-Maximilians-Universität München Großhadern
Direktor: Prof. Dr. med. W. Hiddemann

Thema der Dissertation
**BH3-Mimetikum ABT-737 neutralisiert Resistenz durch Überexpression von BCL2
bei FLT3 PTK-Inhibitor-Behandlung in AML-Blasten**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Christine Laseur, geb. Hellinger

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. Karsten Spiekermann

Mitberichterstatter:

Priv. Doz. Dr. Christian Ries

Prof. Dr. Dr. Torsten Haferlach

Dekan:

Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung:

10.12.2015

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

BH3-Mimetikum ABT-737 neutralisiert Resistenz durch Überexpression von BCL2 bei FLT3 PTK-Inhibitor-Behandlung in AML-Blasten

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 13.06.2015

Christine Laseur

in Dankbarkeit meiner Familie gewidmet

Danksagung

Ich möchte mich bei denjenigen bedanken, die diese Arbeit möglich gemacht haben. Hervorzuheben sind hier mein Betreuer **Prof. Dr. Karsten Spiekermann** und mein Doktorvater **Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann**.

Ein besonderer Dank gilt **Tobias Kohl**, unter seiner Anleitung und Hilfe wurde ein Großteil der Versuche im Labor durchgeführt. Er verstand es mich zu motivieren und stand mir mit Rat und Tat zur Seite.

Großen Dank möchte ich überdies **allen Mitgliedern der KKG Leukämie** für die freundliche und kollegiale Zusammenarbeit aussprechen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Kohl TM, **Hellinger C**, Ahmed F, Buske C, Hiddemann W, Bohlander SK, Spiekermann K, BH3 mimetic ABT-737 neutralizes resistance to FLT3 inhibitor treatment mediated by FLT3-independent expression of BCL2 in primary AML blasts. *Leukemia* 2007; 21 (8): 1763-1772.

Folgende in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen entstanden in Zusammenarbeit mit Kohl TM: Abb. 3.1, Abb. 3.3, Abb. 3.6, Abb. 3.7, Abb. 3.12, Abb. 3.15;

INHALT

1	<u>EINLEITUNG</u>	10
1.1	AKUTE MYELOISCHE LEUKÄMIE	10
1.2	DIE REZEPTORTHYROSINKINASE FLT3	12
1.2.1	FLT3-ITD	12
1.2.2	FLT3-TKD-MUTATIONEN/PUNKTMUTATIONEN	13
1.3	TYROSINKINASE-INHIBITOREN	13
1.4	DATENLAGE VIELVERSPRECHENDER FLT3- INHIBITOREN IN DER THERAPIE DER AML	14
1.4.1	CEP701 (LESTAUTINIB)	15
1.4.2	BAY 43-9006 (SORAFENIB)	15
1.4.3	AC220 (QUIZARTINIB)	16
1.4.4	AUSBLICK DER ZIELGERICHTETEN THERAPIE MIT FLT3-INHIBITOREN	17
1.5	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	17
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	19
2.1	REAGENZIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	19
2.1.1	MATERIAL FÜR DIE ZELLKULTUR	19
2.1.2	PUFFER, LÖSUNGEN UND GELE	19
2.1.3	INHIBITOREN UND REAGENZIEN	21
2.1.4	ANTIKÖRPER FÜR WESTERN-BLOT	21
2.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	21
2.2.1	DNA-KONSTRUKTE	21
2.2.2	TRANSDUKTION VON BA/F3-ZELLEN	22
2.3	ZELLKULTUR	22
2.3.1	KULTIVIEREN VON ZELLEN	22
2.3.1.1	Zelllinien	22
2.3.1.2	Patientenproben	23
2.3.1.3	Übersicht über die Daten der verwendeten Patientenproben	23
2.3.1.4	Proben der gesunden Spender	24
2.3.2	EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN	24
2.3.3	HERSTELLUNG VON WEHI-ÜBERSTÄNDEN ALS IL-3-QUELLE	24
2.4	ZELLPROLIFERATIONSASSEYS	25
2.4.1	ANSÄTZE MIT BA/F3-ZELLEN	25

2.4.2	EXPERIMENTE MIT LEUKÄMISCHEN ZELLEN	25
2.4.3	KOMBINATIONSEXPERIMENTE MIT PATIENTENZELLEN	25
2.5	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	26
2.5.1	APOPTOSEMESSUNG MITTELS ANNEXIN-V-/7-AAD-MESSUNG	26
2.5.2	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE VON PATIENTENPROBEN	26
2.6	PROTEINANALYSE	27
2.6.1	PROTEINISOLATION	27
2.6.2	PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD	27
2.6.3	IMMUNPRÄZIPITATION (IP)	27
2.6.4	SDS-PAGE	28
2.6.5	WESTERN-BLOT	28
2.6.6	STRIPPING DER NITROZELLULOSEMEMBRAN	29
2.7	ELEKTRONISCHE DATENVERARBEITUNG	30
2.7.1	STATISTIK	30
2.7.2	DENSIDOMETRIE	30
2.7.3	BESTIMMUNG KOMBINATORISCHER INDIZES NACH CHOU UND TALALAY	30

3 ERGEBNISSE **31**

3.1	BCL2 IST EIN FLT3-UNABHÄNGIGER THERAPEUTISCHER ANGRIFFSPUNKT IN PRIMÄREN AML-ZELLEN	31
3.1.1	BCL2 WIRD IN HOHEM MAßE IN AML-ZELLEN EXPRIERT	31
3.1.2	FLT3-INHIBITION HAT KEINEN EINFLUSS AUF BCL2-EXPRESSION IN AML-ZELLEN	32
3.2	ABT-737 FÜHRT ZU VERBESSERTEM ANSPRECHEN AUF FLT3-INHIBITOR- BEHANDLUNG IN AML-ZELLINIEN	33
3.2.1	BCL2 SOWIE BCL-XL VERLEIHEN BA/F3-ZELLEN RESISTENZ GEGENÜBER SU5614	33
3.2.2	INHIBITION VON BCL2 STELLT DIE EMPFINDLICHKEIT GEGENÜBER FLT3-INHIBITOR- BEHANDLUNG IM BA/F3-ZELLINIEN-MODELL WIEDER HER	34
3.2.3	BEHANDLUNG MIT ABT-737 FÜHRT IN BA/F3-ZELLEN ZU ERHÖHTER EXPRESSION VON CASPASE-3-SPALTPRODUKTEN	35
3.3	ABT-737 INDUZIERT APOPTOSE IN AML-ZELLINIEN	36
3.3.1	BEHANDLUNG MIT ABT-737 FÜHRT IN AML-ZELLINIEN ZU ERHÖHTER EXPRESSION VON CASPASE-3-SPALTPRODUKTEN	38
3.3.2	ABT-737 INDUZIERT APOPTOSE IN AML-ZELLINIEN, NICHT ABER IN BCR-ABL-POSITIVEN ZELLEN	38
3.3.3	MCL1 WIRD IN BCR-ABL-POSITIVEN ZELLEN IN HOHEM MAßE EXPRIERT	39
3.4	BCL2-INHIBITION FÜHRT SPEZIFISCH ZU APOPTOSE IN PRIMÄREN AML-BLASTEN	39
3.4.1	AKTIVIERTE T-LYMPHOZYTEN SIND RESISTENT GEGEN ABT-737	41

3.5	BCL2-INHIBITION WIRKT SYNERGISTISCH ZU FLT3-INHIBITOR-BEHANDLUNG	43
3.5.1	DIE KOMBINATION VON ABT-737 UND SU5614 ZEIGT BEI BEHANDLUNG VON AML-ZELLINIEN MIT FLT3-ITD SYNERGISTISCHEN EFFEKT	43
3.5.2	FLT3-INHIBITOR-BEHANDLUNG FÜHRT ZU INDUKTION VON BIM	44
3.5.3	DIE KOMBINATION VON ABT-737 UND SU5614 ZEIGT BEI BEHANDLUNG VON PRIMÄREN AML-PROBEN EINEN SYNERGISTISCHEN EFFEKT	45
4	<u>ZUSAMMENFASSUNG UND KLINISCHER ASPEKT</u>	<u>47</u>
5	<u>DISKUSSION</u>	<u>48</u>
5.1	WIE KOMMT ES ZU ÜBEREXPRESSION VON BCL2 IN AML-ZELLEN ?	48
5.1.1	MICRO-RNAS ALS MÖGLICHE GEGENSPIELER ZU BCL2	48
5.1.2	DAS FUSIONSPROTEIN AML-1/ETO INDUZIERT BCL2 EXPRESSION	49
5.1.3	BCR-ABL FÜHRT ZU DOWNREGULATION VON BCL2	49
5.1.4	IN BCR-ABL-UNABHÄNGIGEN CML-ZELLEN IST RESISTENZ GEGEN STI-571 MIT BCL2 EXPRESSIONSLEVEL ASSOZIIERT	50
5.2	ZUSAMMENSPIEL DER ANTIAPOPTOTISCHEN PROTEINE	50
5.2.1	APOPTOTISCHE PROTEINE IN BCR-ABL-POSITIVEN LEUKÄMIEN	50
5.2.2	APOPTOTISCHE PROTEINE IN LEUKÄMIEN MIT FLT-ITD	51
5.3	PRÄKLINISCHE ENTWICKLUNG VON BCL2- INHIBITOREN	52
5.3.1	MCL1 ÜBEREXPRESSION ALS ERKLÄRUNG FÜR RESISTENZ GEGEN BCL2 INHIBITOREN	52
5.4	KLINISCHE DATENLAGE ZU BCL2-INHIBITOREN	53
5.5	AUSBLICK DER ZIELGERICHTETEN THERAPIE MIT BCL2-INHIBITOREN	54
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>56</u>

1 Einleitung

1.1 Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine heterogene, maligne Erkrankung des blutbildenden Systems. Es kommt durch neoplastische Transformation der hämatopoetischen Stammzellen und Expansion des malignen Zellklons zur Verdrängung der Hämatopoese. Die daraus resultierende Knochenmarkinsuffizienz führt zu Anämie, Granulozytopenie und Lymphozytopenie. Die Inzidenz der AML variiert stark in verschiedenen Altersgruppen, für die USA wird sie mit 1,2/100.000 bei 30-jährigen und mit 20/100.000 bei 80-jährigen Patienten angegeben.¹ Auch die Letalität der AML korreliert mit dem Alter der Patienten. So beträgt laut einer großen klinischen Studie die Fünf-Jahres-Überlebensrate der unter 55-jährigen Patienten etwa 40 %, die der über 55-jährigen jedoch nur noch weniger als 10 %.² Das Tumorregister München gibt ein Fünf-Jahres-Überleben von 28,9 % aller dort von 1998 bis 2012 registrierten AML-Patienten an.³

Diagnose und Einteilung der AML erfolgt durch zytomorphologische Beurteilung von Blut- und Knochenmarkausstrichen in Kombination mit zytochemischer Analyse mittels Myeloperoxidase- und Esterasefärbung. Obwohl diese Beurteilungsmethoden vor allem in der Erstdiagnose eines jeden Patienten unverzichtbar sind, hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass Antigen-Expression und zytogenetische Veränderungen großen Einfluss auf die Prognose der Patienten haben. Bisher sind mehr als 100 verschiedene Mutationen und/oder Gen-Rearrangements beschrieben; somit weiß man über genetische Veränderungen der AML wahrscheinlich mehr als über jede andere menschliche Krebsform. Diese Veränderungen lassen sich grob in zwei Gruppen unterteilen. Die eine Gruppe umfasst Mutationen, die den Zellen einen Wachstums- und Überlebensvorteil verschaffen, die andere Gruppe beinhaltet Mutationen, welche in den Zellen den Verlust der Differenzierungsfähigkeit sowie eine Selbsterneuerungstendenz zur Folge haben. Wie man in Knochenmarktransplantationsstudien mit Mäusen zeigen konnte, ist mindestens eine Mutation sowohl aus der einen als auch aus der anderen Gruppe erforderlich, um eine Leukämie hervorzurufen. Basierend auf diesen Erkenntnissen hat sich ein Zwei-Mutationen-Modell der Pathogenese der AML entwickelt.⁴

Therapiert wird die AML mittels Chemotherapeutika. Es gibt sowohl für die Induktions- als auch für die Erhaltungstherapie eine Reihe unterschiedlicher Regimes. Das grundlegende Therapieprinzip und auch die schlechte Prognose der AML haben sich jedoch trotz dem ständigem Wissenszuwachs in den letzten Jahren nicht grundlegend geändert. Eine Transplantation von Knochenmark oder Stammzellen kann die Prognose verbessern, kann aber in vielen Fällen aufgrund des Alters oder Komorbiditäten von Patienten nicht durchgeführt werden.⁵

Diese Ausführung legt nahe, dass das Ziel der wissenschaftlichen Bemühungen die Identifikation von molekularen Angriffspunkten sein muss, um direkt in die Pathogenese der Erkrankung eingreifen zu können und damit Effizienz und Verträglichkeit der Therapie zu verbessern. Dass eine gezielte, auf die molekularen Defekte ausgerichtete Therapie von überlegener Wirksamkeit sein kann, zeigt das Beispiel der akuten Promyelozytenleukämie (APL). Hier findet sich die Translokation t(15;17), welche zu dem Fusionsprotein PML/RAR- α und somit zu einer Hemmung der Differenzierung im Stadium der Promyelozyten führt. Das Vitamin-A-Derivat all-trans-Retinsäure (ATRA) hebt diesen Effekt auf. Seit der Einführung von ATRA ist die APL mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 80% zu einer der Subtypen der AML mit der besten Prognose geworden.⁶

Ein weiteres Beispiel für die Effizienz der Therapie von hämatologischen Erkrankungen auf molekularer Ebene ist der Tyrosin-Kinase-Inhibitor STI571 (Imatinib, Gleevec®). In der chronisch-myeloischen Leukämie (CML) eingesetzt, blockiert er die BCR-ABL-Kinase-Aktivität und führt im Frühstadium der Erkrankung bei nahezu allen Patienten zur Remission⁷ (siehe hierzu Kapitel 1.3). Auch im Spätstadium der CML zeigt STI571 bei einem Großteil der Patienten Effektivität⁸, allerdings sind Remissionen auf Grund einer sich durch Mutationen der BCR-ABL-Kinase-Domäne oder Genamplifikationen entwickelnden Resistenz leider von kurzer Dauer.⁹ Die Erfolg versprechenden angeführten Beispiele spornen die Wissenschaft weiter an, basierend auf dem Zwei-Mutationen-Modell eine genotyp-spezifische molekulare Therapie der verschiedenen Subtypen der Leukämie zu entwickeln und somit eine kausale Therapie der Erkrankung zur Verfügung zu stellen. In diesem Zusammenhang zeigt sich die Rezeptorthyrosinkinase FLT3 als ein vielversprechender Angriffspunkt für die Entwicklung einer solchen Therapie bei der AML.¹⁰

1.2 Die Rezeptor-tyrosinkinase FLT3

Proteintyrosinkinasen spielen bei der Entstehung und der Prognose einer Reihe neoplastischer Erkrankungen eine entscheidende Rolle. Man unterscheidet zytoplasmatische Tyrosinkinasen wie z. B. BCR-ABL von transmembranösen Rezeptortyrosinkinasen (RTK). Zu letzter Gruppe zählt FLT3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*, CD135, FLK-2 oder STK-1) welche auf der Oberfläche unreifer hämatopoetischer Zellen exprimiert wird. Anhand der Homologie der Aminosäure-Sequenz ihrer Kinasedomäne werden die RTKs klassifiziert. FLT3 wird der Klasse III zugeordnet. Für RTKs dieser Klasse ist eine unterbrochene Kinase-Domäne kennzeichnend.¹¹ Ihr Aufbau ist durch fünf immunglobulinähnliche Domänen, einer juxtamembranösen Domäne, zwei Protein-Tyrosinkinase-Domänen und einer Interkinase-Domäne charakterisiert.^{12 13 14} Nach Bindung des FLT3-Liganden (FL) kommt es zu einer Rezeptoroligomerisierung mit anschließender Autophosphorylierung des Rezeptors und somit zur Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden.¹⁵ FLT3 wird auf 70–100 % der Blasten akuter myeloischer Leukämien exprimiert.¹⁶ Wird FLT3 mittels FL stimuliert, kommt es zur Induktion von BCL-2 und zur Verhinderung von Apoptose.¹⁷

1.2.1 FLT3-ITD

In Abwesenheit eines Liganden ist FLT3 eine inaktive Kinase, deren Aktivierung unter physiologischen Bedingungen strengstens reguliert ist. Bestimmte Mutationen führen zu einer konstitutiven Aktivierung und somit zu permanenter Signalaktivität. Die häufigsten dieser Mutationen sind FLT3-ITD, sie kommen bei 15–35 % der Patienten mit AML vor.¹⁸ Sie bestehen aus internen Tandemduplikationen (ITD) und Insertionen, d. h. ein Teil der juxtamembranösen Sequenz wird in-frame dupliziert und in der gleichen Orientierung wie die Originalsequenz eingefügt.¹⁹ Die dadurch verlängerte juxtamembranöse Domäne verliert ihre regulatorische Funktion. Das bedeutet: Zellen mit FLT3-ITD haben eine konstitutive Tyrosinkinaseaktivität und können, in IL3-abhängige Zelllinien transduziert, faktorunabhängiges Wachstum induzieren.²⁰

1.2.2 FLT3-TKD-Mutationen/Punktmutationen

Neben FLT3-ITD treten in der AML bei bis zu 5–10 % der Patienten auch Punktmutationen in der Tyrosinkinase-Domäne von FLT3 auf; diese werden unter dem Begriff FLT3-TKD-Mutationen zusammengefasst. Am häufigsten sind die Kodons 835 und 836 betroffen; meist handelt es sich um einen Austausch von Aspartat 835 zu Tyrosin (FLT3D835Y). Es wurden zahlreiche weitere Punktmutationen beschrieben; diese haben alle die Gemeinsamkeit, aktivierend zu wirken, und zeigen – wie die FLT3-ITD – Faktorunabhängigkeit, wenn sie in IL-3-abhängigen Zelllinien exprimiert werden.²¹⁻²³

Sowohl FLT3-ITD als auch FLT3-TKD-Mutationen führen über eine konstitutive Kinaseaktivität zur Aktivierung von STAT5 (*signaltransducer and activator of transcription 5*) und von MAP (*mitogen activated protein kinase*), welche eine wichtige Funktion in der intrazellulären Signaltransduktion von Proliferations- und Differenzierungssignalen zugeschrieben werden.²⁴⁻²⁷

In Knochentransplantationsmodellen bei Mäusen können FLT3 interne Tandemduplikationen ein letales myeloproliferatives Syndrom hervorrufen.²⁸

1.3 Tyrosinkinase-Inhibitoren

Obwohl nach dem Zwei-Mutationen-Modell FLT3-ITD oder FLT3-TKD-Mutationen alleine nicht ausreichend sind, um einen AML-Phenotyp zu induzieren, stellen sie dennoch einen interessanten therapeutischen Angriffspunkt in der Therapie der AML dar. Mutierte und damit konstitutiv aktivierte Rezeptortyrosinkinasen eignen sich in hohem Maße als Zielstrukturen in der Therapie von hämatologischen Neoplasien. Am Beispiel des kleinmolekularen ABL-Inhibitors Imatinib (Glivec®) konnte eindrucksvoll die Wirksamkeit dieses Prinzips für Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) unter Beweis gestellt werden. Imatinib inhibiert die zytoplasmatischen Kinasen ABL und BCR-ABL sowie die Rezeptortyrosinkinasen KIT und PDGFRB im submikromolaren Bereich. Ein Problem bei der Imatinib-Behandlung von CML-Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung, z.B. in der Blastenkrise, stellt die Entstehung von Resistenzen dar, die insbesondere durch Punktmutationen in BCR-ABL (beispielsweise T315I), auftreten.⁵³

Seit dem erfolgreichen Anwenden von Imatinib in der Therapie der Philadelphia-

Chromosom-positiven CML wurde über die Wirksamkeit einer Reihe weiterer kleinmolekularer Inhibitoren berichtet, die auf das in der AML sehr vielversprechende Target FLT3 abzielen sollten. Mindestens vier davon befinden sich bereits in Phase-I oder Phase-II-Studien, CEP-701, PKC412, die Indolinone SU11248 und SU5416 sowie MLN518.^{54,55}

Die Arbeitsgruppe von Spiekermann konnte bereits zeigen, dass der PTK-Inhibitor SU5614 zu Zelltod und Wachstumsstopp in leukämischen Zelllinien mit aktivierenden FLT3-Mutationen führt.²⁴ Es wurde bereits beschrieben, dass die Dephosphorylisierung von FLT3 nicht zwingend eine Zytotoxizität in AML-Blasten von Patientenproben hervorrufen muss.²⁹ Ebenfalls in dieser Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte, von FLT3 unabhängige Expression von anti-apoptotischen Proteinen wie BCL-xL in Ba/F3-Zellen eine Resistenz gegenüber FLT3-Inhibitoren induzieren kann.³⁰ Somit liegt die Frage nahe, ob die Aktivität von anti-apoptotischen Proteinen der BCL2-Familie Einfluss auf die Resistenz von primären AML-Zellen bei der Behandlung mit FLT3 PTK-Inhibitoren hat.

1.4 Datenlage vielversprechender FLT3- Inhibitoren in der Therapie der AML

Derzeit existieren für FLT3-ITD-positive Patienten, welche ein Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation erleiden, nur eingeschränkte Therapiemöglichkeiten. Aktuell befinden sich einige FLT3-Inhibitoren wie Sunitinib, Tandutinib, Sorafenib, Midostaurin, Quizartinib und Lestaurtinib in klinischer Erprobung. Takahashi et al.⁵⁸ untersuchten im Rahmen einer retrospektiven Studie mit 120 FLT3-positiven, nach Erstlinientherapie relapsierten bzw. refraktären Patienten die Wirksamkeit einer Salvagetherapie mit oder ohne einem FLT3-Inhibitor (Sorafenib, Quizartinib, Lestaurtinib, Midostaurin, KW-2449). Hierbei zeigte sich im FLT3-Inhibitor-Arm ein signifikanter Unterschied bzgl. des medianen Überlebens (102 vs. 49 Wochen; $p < 0,05$).

Im folgenden wird aufgrund erfolgversprechender klinischer Studienergebnisse auf Lestaurtinib, Sorafenib sowie Quizartinib eingegangen und die aktuelle Datenlage bzgl. einer evtl. Therapierelevanz dieser Substanzen diskutiert.

1.4.1 CEP701 (Lestaurtinib)

Lestaurtinib ist ein oral verfügbares Indolocarbazolderivat welches initial als Inhibitor des Neurotrophin Rezeptors TrkA identifiziert wurde. Small et al.⁵⁹ beschrieben 2002 erstmals die Toxizität gegenüber AML-Blasten mit FLT-ITD Mutation in vitro sowie im Mausmodell in vivo. Im Rahmen einer Phase-II-Studie konnte die Reduktion des Blastenanteils im peripheren Blut sowie im Knochenmark bei einem FLT3-positivem, für intensive Chemotherapie ungeeignetem Patientenkollektiv gezeigt werden.⁶⁰ Selbige Arbeitsgruppe untersuchte 2011 in einer randomisierten Studie 224 Patienten mit einem Rezidiv einer FLT3-positiven AML. Im Studienarm derer, die Lestaurtinib zusätzlich zur konventionellen Chemotherapie erhielten, zeigte sich im vergleich zu alleiniger chemotherapeutischer Behandlung kein signifikanter Unterschied bzgl. des Therapieansprechens bzw. des medianen Überlebens.⁶¹ Ein Erklärungsansatz für dieses eher ernüchternde Studienergebnis könnte im Patientenkollektiv liegen. Möglicherweise lagen bereits verschiedene Resistenzmechanismen, beispielsweise Resistenzmutationen oder eine Hochregulation von FLT3 bzw. - wie in dieser Arbeit beleuchtet – anderer antiapoptotischer Proteine vor. Die in dieser Studie äußerst variable Bandbreite der Plasmakonzentrationen von Lestaurtinib im steady-state könnte eine zusätzliche Erklärung für das fehlende Ansprechen im Lestaurtinib-Arm sein. Diese These wird durch eine aktuelle randomisierte Studie mit 118 eingeschlossenen, in diesem Fall erstdiagnostizierten FLT3-positiven AML-Patienten untermauert, in welcher nach Erreichen adäquater Plasmaspiegel ein verbessertes Outcome unter zusätzlicher Lestaurtinib Gabe beschrieben wurde.⁶² Die weitere Entwicklung der Kombinationstherapie aus Chemotherapeutika und sequentieller Lestaurtinib-Gabe wird derzeit im Rahmen der fortgeführten NCRI AML17 Studie evaluiert.

1.4.2 BAY 43-9006 (Sorafenib)

Sorafenib ist ein oral verfügbarer Multikinaseinhibitor welcher Proliferation und Angiogenese durch Inhibition von Raf-Kinasen, c-Kit, VEGFR-2 und -3 sowie PDGFR hemmt. Aktuell zur Therapie des fortgeschrittenen Nieren - und Leberzellkarzinoms zugelassen, rückte Sorafenib nach Beschreibung der effektiven FLT3-Rezeptor-Hemmung sowohl in vitro als auch in vivo⁵⁷ als mögliches Targetherapeutikum der AML in den Vordergrund. Shi YX et al. zeigten 2008 erstmalig im Rahmen einer Phase-I-Studie die klinische Wirksamkeit einer Monotherapie mittels Sorafenib an

acht FLT3-ITD-positiven AML Patienten, acht weitere FLT3-ITD-negative Patienten sprachen auf die Therapie nicht an. Allerdings steht die nachgewiesene Wirksamkeit von Sorafenib bei FLT3-ITD-Patienten in einem gewissen Gegensatz zu den eher ernüchternden Ergebnissen weiterer Phase-I- und -II- Studien mit anderen FLT3-Inhibitoren.⁵⁶ Mehrheitlich waren die damals eingeschlossenen AML-Patienten allerdings ohne FLT3-ITD-Mutation, ein evtl. Erklärungsansatz für die diskrepanten Ergebnisse. Ob dieses Patientenkollektiv nun ebenfalls von einer Sorafenib Monotherapie profitiert, kann derzeit nicht mit Sicherheit beantwortet werden.

Safaian et al.⁶³ beschrieben erstmalig den vielversprechenden Verlauf unter Sorafenib bei einem FLT-ITD-positiven Patienten im Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation. Auch Metzelder et al.⁶⁴ konnten bei drei von fünf Patienten eine komplette molekulare Remission unter Sorafenib nach stattgehabter allogener Stammzelltransplantation beobachten. Langzeitremissionen unter dieser Therapie waren jeweils mit einer moderaten chronischen Abstoßungsreaktion assoziiert. Diese Beobachtung lässt mutmaßen, dass möglicherweise eine frühe therapeutische Intervention, beispielsweise bei Diagnosestellung eines molekularen Rezidivs, zu einem Synergismus zwischen antileukämischer Zytotoxizität mittels FLT-ITD Blockade und dem GvL-Effekts führt. Diese These wird durch das fehlende bzw. signifikant spätere Auftreten einer Sorafenibresistenz nach allogener Stammzelltransplantation gestützt.⁶⁵ Die selbe Arbeitsgruppe untersuchte 2012 im Rahmen einer randomisierten, plazebokontrollierten Studie bei einem älteren Patientenkollektiv mit AML den Benefit unter Standardinduktions- und Konsolidierungstherapie in Kombination mit Sorafenib. Leider zeigten sich hier eher ernüchternde Ergebnisse ohne Vorteile für die Patienten im Sorafenib-Arm.⁶⁹

1.4.3 AC220 (Quizartinib)

Das in 5.3.1 angedeutete Problem einer möglicherweise geringen Effektivität der zielgerichteten Therapie mittels FLT3-Inhibitoren aufgrund mangelnder Potenz unter verträglichen Dosen könnte evtl. durch den neuen FLT3-Inhibitor AC220 (Quizartinib) gelöst werden. Dieser wird daher aufgrund pharmakokinetischer Eigenschaften sowie im Vergleich zu den beschriebenen Inhibitoren hochspezifischer Kinaseaktivität zur zweiten Generation der FLT3 Inhibitoren gezählt. Zarrinkar et al.⁶⁶ verglichen Quizartinib mit FLT3-Inhibitoren der sogenannten ersten Generation (in dieser Versuchsreihe Lestaurtinib, Sorafenib, Midostaurin und Tandutinib) und

charakterisierten Quizartinib basierend auf den Ergebnissen aufgrund seiner außergewöhnlichen Kinasespezifität sowie Effektivität im nanomolaren Dosisbereich im Mausmodell als FLT3-Inhibitor welcher alle wünschenswerten Eigenschaften für die klinische zielgerichtete Therapie vereint.

In einer ersten Phase-I-Studie bei relapsierten bzw. refraktären AML-Patienten sprachen 30% der 76 eingeschlossenen Patienten auf die Therapie mit Quizartinib an, bemerkenswerterweise bereits unter niedrigen Dosen (18 mg bzw. 40 mg/d). Die Tatsache dass, insgesamt 56% der FLT3-ITD-positiven Patienten verglichen mit lediglich 19% der FLT3-wt-Träger Responder waren, lässt eine hohe Spezifität des Agens vermuten.⁶⁷ Dieser Sachverhalt ist Untersuchungsgegenstand in aktuell laufenden Phase-II-Studien.

1.4.4 Ausblick der zielgerichteten Therapie mit FLT3-Inhibitoren

Zusammenfassend kann zum derzeitigen Zeitpunkt von einer Effektivität einer Monotherapie mit FLT3-Inhibitoren ausgegangen werden, komplette Remission bzw. Remissionserhaltung wird jedoch eine Kombinationstherapie aus konventioneller Chemotherapie mit FLT3-Inhibitoren oder anderen Substanzen erfordern. Neuere Strategien – wie die zielgerichtete Therapie gegen onkogenetische Signalwege auf unterschiedlichen Ebenen oder das Zerstören von Interaktionen von AML-Stromazellen könnten als additive Therapieregime zukunftsweisend sein.⁶⁸ Die Ergebnisse multipler randomisierter klinischer Studien bei erstdiagnostizierten FLT3-positiven AML Patienten unter Kombinationstherapie mit und ohne FLT3-Inhibitor werden mit Spannung erwartet und werden die Entwicklung dieser vielversprechenden, zielgerichteten Therapieform in den nächsten Jahren vorgeben.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Basierend auf dem Erfolg des molekularen Hemmstoffes Imatinib in der Therapie der CML wurde verstärktes wissenschaftliches Augenmerk auf das Generieren selektiver Proteintyrosinkinaseinhibitoren für FLT3 gelegt. Die Zytotoxizität in primären AML Blasten und das klinische Ansprechen zeigten sich trotz der Fähigkeit der FLT3 Inhibitoren den mutierten sowie den Wildtyp FLT3-Rezeptor vollständig zu dephosphorylieren sehr heterogen. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen versucht diese Arbeit zu liefern. Sie soll erstens klären, ob das antiapoptotische

Protein BCL2 einen unabhängigen Angriffspunkt in primären AML Zellen darstellt. Desweiteren soll untersucht werden, ob eine Inhibition von BCL2 mit dem BH3-Mimetikum ABT-737 alleinig oder evtl. in Synergismus mit FLT3-Inhibitoren zu vermehrter Apoptose in AML-Zellen führt.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

2.1.1 Material für die Zellkultur

Material	Bezugsquelle
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)	PAN oder Gibco, Deutschland
EDTA	Gibco BRL, Deutschland
Fötales bovines Serum (FBS)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Phospat-gepufferte Salzlösung (PBS)	PAN, Deutschland
Plastikverbrauchsmaterial	Costar, Sarstedt, Nunc oder Becton Dickinson, Deutschland
RPMI-1640 + GlutaMAX Medium	PAN oder Gibco, Deutschland
Sterilfilter Filtropur S02, Ø 0,2 µm	Sarstedt, Deutschland
Streptomycin	Gibco, Deutschland
Trypanblau	Gibco, Deutschland
Trypsin	Gibco, Deutschland
Zellkulturplatten/-flaschen	Greiner oder Sarstedt, Deutschland

2.1.2 Puffer, Lösungen und Gele

Material	Beschreibung	Bezugsquelle
2 % Agarosegel	2 g Agarose, 100 ml 1 x TBE	Chemikalien von Sigma, Deutschland
2 x BBS	280 mM NaCl; 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O; 50 mM BES; H ₂ O (bidest) ad 500 ml	Chemikalien von Sigma, Deutschland
1 x Bio-Rad-Dye	Bio-Rad-Dye-Reagenz 1:5 mit H ₂ O verdünnt	Bio-Rad, Deutschland
DMSO	Dimethylsulfoxid	Sigma, Deutschland
10 x Elektrophorese-Puffer	30 g Tris; 144 g Glycin; 800 ml H ₂ O; 10 g SDS (Natriumdodecylsulfat)	Chemikalien von Sigma, Deutschland
1 x G-NET	2,5 g Gelatine in 100 ml 10 x NET gelöst und aufgeköcht und H ₂ O ad 1 l	Chemikalien von Sigma, Deutschland
HEPES-Puffer	50 mM HEPES pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % Triton X-100; 10 % Glycerol	Chemikalien von Sigma, Deutschland
4 x HNTG-Puffer	200 mM HEPES pH 7,5; 600 mM NaCl; 0,4 % Triton X-100; 40 % Glycerol	Chemikalien von Sigma, Deutschland
Lämmli-Puffer	187,5 mM Tris; 6 % SDS; 30 % Glyzerin; Bromphenolblau	Chemikalien von Sigma, Deutschland
Lämmli-DTT-Puffer	2,5 ml Lämmli-Puffer; 0,6 g DTT (Dithiothreitol)	Chemikalien von Sigma, Deutschland

10 x NET	1,5 M NaCl; 0,05 M EDTA pH 8; 0,5 M Tris pH 7,5; 0,5 % Triton X-100	Chemikalien von Sigma, Deutschland
Ponceau-Rot	1 g Ponceau S in 500ml 2 % Trichloressigsäure gelöst	Chemikalien von Sigma, Deutschland
RIPA-Puffer	0,5 M Tris-HCl pH 7,4; 2,5 % Deoxycholat; 1,5 M NaCl; 10 mM EGTA pH 7; 1 ml NP-40; 100 mM PMSF; 100 mM Orthovanadat (Na ₃ VO ₄); 1 mg/ml Aprotinin; 1 mg/ml Leupeptin; 0,1 mg/ml Pepstatin; 100 mM NaF; H ₂ O	Chemikalien von Sigma und Fluka, Deutschland
4 % Sammelgel	6,1 ml H ₂ O; 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 ohne SDS; 1,3 ml Acrylamid (Mischung aus Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 30:0,8) 100 µl 10 % SDS; 50 µl 10 % APS (Ammoniumpersulfat); 10 µl TEMED (N',N',N',N'-Tetramethyldiamin)	Chemikalien von Sigma und Roth, Deutschland
Strippinglösung	800 ml 3xTBS-T; 20 ml Mercapthoethanol; 200 ml 10 % SDS (Natriumdodecylsulfat)	Chemikalien von Sigma, Deutschland
5 x TBE	54 g Tris; 27,5 g Borsäure; 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0; H ₂ O (Millipore) ad 1l	Chemikalien von Sigma, Deutschland
10 x TBS	10 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl	Chemikalien von Sigma, Deutschland
1 x TBS-T	100ml 10 x TBS; 1% Tween 20; H ₂ O ad 1 l	Chemikalien von Sigma, Deutschland
3 x TBS-T	300ml 10 x TBS; 15ml Tween 20; H ₂ O ad 1l	Chemikalien von Sigma, Deutschland
Transfektionsmix	300 µl 2xBBS; 30 µl CaCl ₂ 2,5M; 6 µl DNA (1 µg/µl); H ₂ O ad 600 µl	Chemikalien von Sigma, Deutschland
10 x Transblot	72,75 g Tris; 36,63 g Glycin; 0,475 g SDS	Chemikalien von Sigma, Deutschland
1 x Transblot	10 x Transblot 1:10 mit Methanol 20%	Chemikalien von Sigma, Deutschland
15 % Trenngel	2 g Saccharose; 3,3 ml H ₂ O; 11,3 ml Tris pH 8,8 ohne SDS; 15 ml Acrylamid; 150 µl 20 % SDS; 100 µl 10 % APS und 3 µl TEMED	Chemikalien von Sigma, Deutschland
12,5 % Trenngel	2 g Saccharose; 2,9 ml H ₂ O; 5,65 ml Tris pH 8,8 ohne SDS; 6,25 ml Acrylamid; 75 µl 20 % SDS, 50 µl 10 % APS und 1,5 µl TEMED	Chemikalien von Sigma, Deutschland
7,5 % Trenngel	5,4 ml H ₂ O; 5,65 ml Tris pH 8,8 ohne SDS; 3,75 ml Acrylamid; 75 µl 20 % SDS, 50 µl 10 % APS und 1,5 µl TEMED	Chemikalien von Sigma, Deutschland
Tris-HCl pH 8,8	1,5 M Tris; mit HCl auf pH 8,8 eingestellt	Chemikalien von Sigma, Deutschland
Tris-HCl pH 6,8	1,5 M Tris; mit HCl auf pH 6,8 eingestellt	Chemikalien von Sigma, Deutschland

2.1.3 Inhibitoren und Reagenzien

Das kleinmolekulare BH3-Mimetikum ABT-737 und dessen Enantiomer mit geringer Bindungsaffinität zu BCL-2 (ABT-CTRL) wurden freundlicherweise von Abbott Laboratories (Abbott Park, IL, USA) zur Verfügung gestellt. Die PTK-Inhibitoren SU5614 und MG-132 wurden von Calbiochem-Novabiochem (Deutschland) erworben, das besser wasser-lösliche Sunitinib von Sequoia Research (Pangbourne, UK) bezogen. Alle Inhibitoren wurden in DMSO gelöst und in Stock-Konzentrationen von 10 mM aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die durchflusszytometrischen Apoptosemessungen wurden unter Verwendung des „Annexin V-Phycoerythrin Apoptosis Detection Kit“ von Becton Dickinson (Deutschland) durchgeführt. Antikörper für Durchflusszytometrie wurden von Becton Dickinson (Deutschland) bezogen.

2.1.4 Antikörper für Western-Blot

Antikörper		Bezugsquelle
anti-FLT3/flk2	S-18	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-PY	PY99	
anti-MCL1	S-19	
anti-BCL-xL	H-5	
anti-BCL2	Bcl-2	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
anti-β-Actin	AC-15	
anti-cleaved-Caspase-3	Asp175	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 DNA-Konstrukte

cDNA für BCL2 wurde uns freundlicherweise von Dr. Zhongwei Xu ⁴⁹ zur Verfügung gestellt. Von Dr. Stanley Korsmeyer's Labor (Howard Hughes Medical Institute, Harvard Medical School, Boston, MA, USA) erhielten wir menschliche cDNA für BCL-xL. Die cDNA Konstrukte wurden in den retroviralen MSCV-IHRES-EYFP/EGFP-Expressionsvektor subkloniert (bezogen von The Terry Fox Laboratory, University of British Columbia, Vancouver, Kanada).

2.2.2 Transduktion von Ba/F3-Zellen

2×10^5 Ba/F3-Zellen wurden in 1 ml Wachstumsmedium ausgesät und anschließend in der Anwesenheit von 8 µg/ml Polybrene mit 200 µl des retroviralen Überstandes transduziert. Nach 48 Stunden wurden die EGFP/EYFP-positiven Zellen mit Hilfe eines Zellsortiergerätes (FACS-Vantage-System mit Turbo-Sort device, Becton-Dickinson, USA) isoliert.

2.3 Zellkultur

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter Laminar-Flow-Sterilbänken (BDK Luft- und Reinraumtechnik, Deutschland) durchgeführt. Medien und Zusätze wurden gekühlt aufbewahrt und vor Verwendung in einem Wasserbad (Schütt, Deutschland) auf 37 °C erwärmt.

2.3.1 Kultivieren von Zellen

2.3.1.1 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien (Ba/F3, MV4-11, MOLM-13, Kasumi-1, KCL-22, SD-1, K-562, HL-60, WEHI) wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ; Deutschland) oder der American Type Culture Collection (ATCC; USA) bezogen und nach den Empfehlungen der Vertreibergesellschaften kultiviert. Bei Ba/F3-Zellen handelt es sich um Pro-B-Zellen aus dem peripheren Blut von BALB/c-Mäusen. Die beiden FLT3ITD-positiven AML-Zelllinien MOLM-13 und MV4-11 stammen von Patienten mit FAB-M5a-Leukämie. MV4-11 ist durch eine Translokation t(4;11) gekennzeichnet. Kasumi-1, ebenfalls eine AML-Zelllinie, trägt die zu einem AML/ETO-Fusionsprotein führende Translokation t(8;21). Die bereits im Jahre 1976 generierte AML-Zelllinie HL-60 stammt von einem Patienten mit einer FAB-M2-Leukämie. K-562 ist die erste humane Zelllinie, welche generiert wurde, und entstammt dem Blut einer 53-jährigen Patientin mit einer sich in der Blastenkrise befindlichen BCR-ABL-positiven CML. Auch bei KCL-22 handelt es sich um eine BCR-ABL-positive CML-Zelllinie; sie wurde aus dem Pleurapunktat einer 35-jährigen Patientin in der Blastenkrise gewonnen. Die Zelllinie SD-1 stammt aus peripheren B-Lymphoblasten eines Patienten mit ALL (*akute lymphatische Leukämie*).

Alle Zelllinien wurden bei 37 °C mit 5 % CO₂ in RPMI-1640-Medium unter Zusatz von 10 % FBS und 5 % Penicillin/Streptomycin kultiviert.

2.3.1.2 Patientenproben

Die in dieser Studie verwendeten Patienten-Proben entstammen den Untersuchungen der AMLCG (German AML Cooperative Group) und wurden dem Labor für Leukämie-Diagnostik zwischen 2002 und 2006 eingesandt. Alle Proben stammen aus Erstdiagnosen und wurden nach Einverständniserklärung der Probanden laut Studienprotokoll einem standardisierten Verfahren unterzogen, das aus Registrierung, zytomorphologischer, zytochemischer, zytogenetischer und molekular-genetischer Untersuchung, Immunphenotypisierung sowie in situ Hybridisierung bestand. Die Studie wurde unter Einhaltung der Grundsätze des Helsinki-Protokolls durchgeführt. Die Patienten-Proben wurden bei 37 °C mit 5 % CO₂ in RPMI-1640-Medium unter Zusatz von 20 % FBS und 5 % Penicillin/Streptomycin kultiviert.

2.3.1.3 Übersicht über die Daten der verwendeten Patientenproben

	FAB	Karyotyp	Alter	FLT3-Mutation
AML #1	M4	46,XX	56	-
AML #2	M1	46,XX	71	-
AML#3	M4	46,XX	53	LM
AML #4	M2	46,XY	60	LM
AML #5	M1	46,XX	68	LM
AML #6	M4	46,XY	47	LM
AML #7	M0	46,XX,inv(3)(q21;q26),-7 [20]	67	LM
AML #8	M1	komplex	73	-
AML #9	M1		66	LM
AML #10	M1	46,XX,t(2;3)(q12;p21) [25]	39	TKD
AML #11	M2	46,XX,t(1;4)(q44;q23) [20]	65	LM
AML #12	M4	46,XX [29]	77	LM
AML #13	M2	46,XY [25]	84	-

Tabelle 1: Übersicht über die Daten der verwendeten Patientenproben.

2.3.1.4 Proben der gesunden Spender

PBMNCs (peripheral blood mononuclear cells) der gesunden Spender wurden direkt nach der Isolation verwendet. Falls angegeben, wurden sie mit Phytohämagglutinin-L (PHA; Roche, Mannheim, Deutschland), einem Wachstumsstimulanz für T-Lymphozyten, für vier Tage entsprechend der Herstellerangaben behandelt und im Anschluss für Apoptose- oder Proteinexpressionsmessungen weiterverwendet.

	Karyotyp	Alter
Donor #1	46,XY	39
Donor #2	46,XY	29
Donor #3	46,XX	25

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten gesunden Spender

2.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden in 1,5 ml Einfriermedium (90 % FBS und 10 % DMSO) aufgenommen und in einem Freezing-Container Typ Cryo 1 °C (Nalgene, Deutschland) bei –80 °C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt und bei –180 °C gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellsuspension rasch erwärmt, in 20–25 ml Medium resuspendiert und, um Reste des zelltoxischen DMSO zu entfernen, sofort abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, es erfolgte die erneute Resuspension in Medium und Kultivierung wie in 2.3.1 beschrieben.

2.3.3 Herstellung von WEHI-Überständen als IL-3-Quelle

WEHI-Zellen (IL-3 produzierende Lymphomzelllinie aus Balb/c Mäusethymus) haben die Eigenschaft, in Kultur IL-3 an das Medium abzugeben. Dieses Medium wurde zentrifugiert und sterilfiltriert, um anschließend bei –20 °C in Aliquots gelagert zu werden. Das somit gewonnene WEHI-konditionierte Medium wurde zur Kultivierung von IL-3-abhängigen Zellen verwandt; für Experimente kam rekombinantes IL-3 zum Einsatz.

2.4 Zellproliferationsassays

2.4.1 Ansätze mit Ba/F3-Zellen

Mit einer Dichte von 4×10^4 Zellen/ml Wachstumsmedium RPMI 1640 mit 10 % FBS wurden die Zellen ausgesät. Die Zelldichte viabler Zellen wurde in einer Neubauer-Zählkammer nach Färbung mit Trypanblau im Durchlichtmikroskop bestimmt. Für Experimente mit PTK-Inhibitoren wurden 48-well-Platten mit 1 ml Wachstumsmedium pro well verwendet.

2.4.2 Experimente mit leukämischen Zellen

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 1 ml RPMI-1640-Medium mit FBS kultiviert. Das Medium für MV4-11-Zellen enthielt 20 % FBS und für alle anderen Zellen 10 % FBS. Anschließend wurden die Zellen mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml in 24-Well-Platten mit verschiedenen Konzentrationen von PTK-Inhibitoren bzw. ohne Inhibitoren ausgesät und bei 37 °C für 72 Stunden kultiviert. Danach wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und in 48-Well-Platten mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen/ml in Kulturmedium ohne Zusatz von Serum ausgesät. SU5614, ABT-737 bzw. ABT-CTRL wurden wie angegeben hinzugefügt. Die Zellen wurden so für 96 Stunden kultiviert, mit Trypanblau gefärbt und anschließend in einer Standard-Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Den in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen liegen jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten zugrunde.

2.4.3 Kombinationsexperimente mit Patientenzellen

Um in Ansätzen mit AML-Proben die Zytotoxizität einer kombinierten FLT3- und BCL2-Inhibition beurteilen zu können, wurden die Zellen zunächst behutsam unter tropfenweiser Zugabe von vorgewärmtem Medium aufgetaut. Durch den wie vom Hersteller angegebenen Gebrauch von DNase I (CellSystems GmbH, St. Katharinen, Deutschland) und anschließender Filterung konnte ein Verklumpen verhindert werden. Den Zellen wurde 10 ng/ml G-CSF (ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland) zugefügt. Danach wurden sie mit aufsteigenden Dosen von SU5614 oder Sunitinib

für 24 Stunden inkubiert und nach Zugabe von ABT-737 (0,0 μ M, 0,01 μ M, oder 0,025 μ M) für weitere 48 Stunden bebrütet.

2.5 Durchflusszytometrie

Für alle Untersuchungen wurde ein Durchflusszytometer vom Typ FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, USA) verwandt.

2.5.1 Apoptosemessung mittels Annexin-V-/7-AAD-Messung

Zur Bestimmung des Anteils an apoptotischen Zellen in einer Kultur wurde das „Annexin V-Phycoerythrin Apoptosis Detection Kit“ von Becton Dickinson (Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Test, welcher auf der Doppelfärbung von apoptotischen bzw. toten Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Annexin V und dem rötlich gefärbten 7-AAD (Aminoaktinomycin) beruht. Viable Zellen tragen das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) nur auf der Innenseite ihrer Membran, während frühapoptotische Zellen es sowohl innerhalb als auch außerhalb ihrer Membran tragen. Das mit Phycoerythrin markierte Annexin V hat die Eigenschaft, spezifisch an PS der Außenseite der Membran zu binden. Somit färbt es lediglich frühapoptotische Zellen an. 7-AAD kann nur in Zellen mit gestörter Membranintegrität eindringen, d. h. in spätapoptotische oder tote Zellen. Die Doppelfärbung erlaubt die Unterscheidung von intakten Zellen (Annexin V-PE negativ, 7-AAD negativ), frühapoptotischen (Annexin V-PE positiv, 7-AAD negativ) und spätapoptotischen bzw. toten Zellen (Annexin V-PE positiv, 7-AAD positiv).

Die Zellen wurden nach Behandlung mit ABT-737, dem Protokoll des Herstellers entsprechend, zweimal mit PBS gewaschen, in Bindungspuffer resuspendiert (1 Million Zellen pro ml), in Portionen von 100 μ l aliquotiert, mit je 5 μ l der Annexin-V-PE- und 7-AAD-Präparationen gefärbt, danach für 15 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit vorsichtig gevortext und anschließend mit 400 μ l Bindungspuffer aufgefüllt. Danach erfolgte die Messung im Durchflusszytometer.

2.5.2 Durchflusszytometrische Analyse von Patientenproben

Zellen aus peripherem Blut bzw. Knochenmark der AML-Patienten wurden entweder direkt nach ihrer Gewinnung bezogen oder aus in flüssigem Stickstoff gelagerten

Aliquots aufgetaut. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden ausschließlich Proben mit einem Blastengehalt über 75 % verwendet. Die Zellen wurden mit den Inhibitoren in den jeweils angegebenen Konzentrationen in 24-well-Platten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation wurden sie – wie bereits beschrieben – mit Annexin V-PE und 7-AAD gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Lediglich Proben, welche eine Zellviabilität größer als 50 % aufwiesen, wurden in folgende Apoptoseversuche eingeschlossen.

2.6 Proteinanalyse

2.6.1 Proteinisolation

Zellen wurden in kaltem PBS gewaschen, in RIPA-Puffer lysiert und 30 Minuten bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden in einer Tischzentrifuge (Typ 5415, Eppendorf, Deutschland) bei 13200 rpm 20 Minuten lang abzentrifugiert. Der Proteinüberstand wurde sofort weiterverwendet oder bei –20 °C gelagert.

2.6.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Konzentrationsbestimmung von Zell-Lysaten wurde die Methode nach Bradford angewandt. Sie beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie-Blau. Hierzu wurden die Lysate 1:10 verdünnt und davon 20 µl mit 1:5 verdünntem BioRad-Dye-Reagenz (BioRad, München) versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen eine reine Farbstoff-Lösung als Leerwert photometrisch gemessen. Um die in den Proben vorhandene absolute Proteinmenge bestimmen zu können, wurde zuvor aus einer definierten Verdünnungsreihe aus BSA-Lösung eine Eichkurve erstellt.

2.6.3 Immunpräzipitation (IP)

Die Immunpräzipitation (IP) bezeichnet ein Verfahren zur Anreicherung von Proteinen aus Ganzzell-Lysaten unter Zuhilfenahme spezifischer Antikörper. Die monoklonalen Antikörper wurden in 30 µl Protein-A/G-Sepharose (Pharmacia Biotech Europe, Deutschland) für etwa 20 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert.

Danach erfolgte die Zugabe von 1–10 mg Proteinlysats. Das Gemisch wurde für mindestens vier Stunden bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde dreimalig mit HEPES-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die erhaltenen Pellets in 20 µl Lämmli-DTT-Puffer aufgenommen und bei 95 °C für fünf Minuten denaturiert. Nach Abzentrifugation in einer Tischzentrifuge (Typ 5415, Eppendorf, Deutschland) bei 13200 rpm konnte der Überstand auf das SDS-PAGE-Gel geladen werden.

2.6.4 SDS-PAGE

Unter SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) versteht man ein Verfahren, mit dessen Hilfe Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden können. Die SDS-PAGE wurden in Elektrophoresekammern vom Typ Protean II xi (Bio-Rad, Deutschland) durchgeführt.

Es wurden 15 %ige Polyacrylamidgele sowie 7,5–12,5 %ige Polyacrylamid-Gradientengele verwendet. Um die Verdunstung zu begrenzen, wurden Trenngele nach dem Gießen mit destilliertem Wasser beschichtet. Nach dem Polymerisieren des Gels wurde das Wasser entfernt, das Trenngel mit einem 4 %igen Sammelgel beschichtet und ein Gelkamm eingelegt. Die Lysate der zu untersuchenden Proteine wurden mit gleichen Volumina Lämmli-DTT-Puffer (enthält Bromphenolblaumarker) versetzt, für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert und in einer Tischzentrifuge (Typ 5415, Eppendorf, Deutschland) bei 9000 rpm eine Minute lang abzentrifugiert. Anschließend konnten die Lysate in die Geltaschen pipettiert werden. Die Molekulargewichtsmarker LMW (low molecular weight calibration kit; Amersham, England) und HMW (high molecular weight standards broad range; Bio-Rad, Deutschland) dienten als Größenreferenz für die Proteine. Die Geltaschen wurden mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt und die Proteine bei 20 bis 32 mA über Nacht aufgetrennt, bis der Bromphenolblau-Marker das Ende des Gels erreicht hatte.

2.6.5 Western-Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels Semi-Dry-Blot-Verfahren vom SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran (Protran, Porengröße 0,45 µm, Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen. Nitrozellulosemembran und Filterpapiere (Schleicher & Schüll, Deutschland) in der Größe des Gels wurden in Transferpuffer äquilibriert. Die Semi-Dry-Elektrophorese-

Transferkammer (Trans-Blot SD, Bio-Rad, Deutschland) wurde wie folgt zusammengesetzt: Anode, drei Filterpapiere, Nitrozellulosemembran, SDS-PAGE-Gel, drei Filterpapiere, Kathode. Der Proteintransfer erfolgte bei 250 mA für mindestens 3 Stunden. Nach dem Blotten wurde die Membran mit destilliertem Wasser gespült und zur Detektion von Marker und semiquantitativer Bestimmung der Protein-Beladung mit Ponceau-S-Lösung angefärbt. Die Molekulargewichtsstandards wurden markiert und durch 20-minütiges Waschen in Blockierungslösung (G-NET) wurde die Membran vollständig entfärbt. Dann wurde die Nitrozellulosemembran mit der entsprechenden Verdünnung des Primärantikörpers (Kaninchen oder Maus) in G-NET bei 4 °C über Nacht auf dem Kippschüttler inkubiert. Anschließend wurde der Blot dreimal für je 15 Minuten mit TBST gewaschen. Danach folgte eine einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper, ein in G-NET verdünntes HRP (*horse radish peroxidase*) -gekoppeltes anti-Kaninchen- oder anti-Maus-Immunglobulin. Erneut erfolgte ein dreimaliges Waschen für jeweils 15 Minuten mit TBS-T. Für die Detektion der gebundenen Antikörper wurde ein ECL-Kit (enhanced chemiluminescence kit, Amersham, England) verwendet. Der Blot wurde eine Minute mit den Reagenzien dieses Kits inkubiert, gegen Austrocknung in Klarsichtfolie verpackt und ein Röntgenfilm (HyperfilmTMECLTM, Amersham, England) bis zu einer Stunde mit der Membran in einer Filmkassette (HypercassetteTM, Amersham, England) belichtet. Für die Entwicklung des Films kam das automatische Entwicklungsgerät des Typs Gevomatic 60 (Agfa, Deutschland) zum Einsatz.

2.6.6 Stripping der Nitrozellulosemembran

Western-Blots, die schon einmal entwickelt worden waren, mussten gestrippt werden, um den gebundenen Antikörper zu entfernen. Die Membranen wurden nach dem Entwickeln einmalig mit TBST gewaschen, mit Stripping-Lösung bedeckt und zweimal für je 15 Minuten bei 65 °C erhitzt und anschließend 30 Minuten mit 3 x TBS-T gewaschen.

2.7 Elektronische Datenverarbeitung

2.7.1 Statistik

Für die statistische Auswertung der Zellzyklusanalysen wurde der t-Test für abhängige und unverbundene Stichproben (Excel; Microsoft, Redmond, WA, USA) verwendet. Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

2.7.2 Densidometrie

Densidometrische Auswertungen der Western-Blots wurden mit dem Programm Tina 2.09 (Raytest Isotopenmessgeräte, Deutschland) durchgeführt.

2.7.3 Bestimmung kombinatorischer Indizes nach Chou und Talalay

Um die Effekte zweier kombinierter Substanzen im Zellkulturmodell bewerten zu können, wurde die Methode nach Chou und Talalay³⁸ herangezogen, welche auf der Bestimmung des so genannten kombinatorischen Index C_i beruht. Der Index C_i lässt sich nach folgender Gleichung berechnen:

$$C_i = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2 + (D)_1 (D)_2 / (D_x)_1 (D_x)_2$$

$(D)_1$ und $(D)_2$ stehen für die Dosen der im Versuch kombinierten Inhibitoren. $(D_x)_1$ und $(D_x)_2$ stellen die jeweilige Dosis des Inhibitors nach Einzelgabe dar. Der Term $(D)_1 (D)_2 / (D_x)_1 (D_x)_2$ geht nur dann in die obige Gleichung ein, wenn es sich um im Wirkmechanismus unabhängige, d.h. nicht um die selbe Bindungsstelle konkurrierende Inhibitoren, handelt.

Ein C_i -Wert kleiner 1 bedeutet Synergismus, ein C_i -Wert größer 1 Antagonismus. Ein Wert gleich 1 deutet auf einen additiven Effekt hin.

3 Ergebnisse

3.1 *BCL2 ist ein FLT3-unabhängiger therapeutischer Angriffspunkt in primären AML-Zellen*

3.1.1 BCL2 wird in hohem Maße in AML-Zellen exprimiert

Es stellte sich die Frage, ob die Aktivität von anti-apoptotischen Proteinen der BCL2 - Familie Einfluss auf die Resistenz von primären AML-Zellen bei der Behandlung mit SU5614 hat. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Expression von BCL2 und BCL-xL in primären Patientenzellen analysiert. Die Mehrheit der Patienten, von welchen die Proben stammten, zeigen einen normalen Karyotyp. Eine Übersicht über die Daten der verwendeten Proben ist in Tabelle 1 zusammengefasst. In Zusammenarbeit mit Kohl TM wurde ein repräsentativer Western-Blot erstellt, welcher das Ausmaß der BCL-2 - bzw. BCL-xl-Expression in den verwendeten Proben widerspiegelt, dieser ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

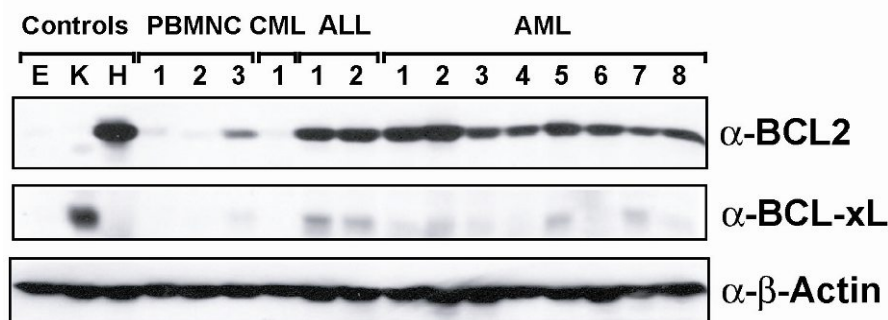


Abbildung 3.1: BCL2 wird in AML-Blasten in hohem Maße exprimiert.

Auswertung der Expression von BCL2 und BCL-xL in primären Proben und Kontroll-Zelllinien (E, H, K, HEK-293, K-562, HL-60) mittels Western-Blot.

Alle getesteten AML-Zellen zeigten ein deutliches Signal für das BCL2-Protein. PBMNC von gesunden Spendern zeigte eine geringere bzw. fehlende BCL2-Expression. Zelllysate von HEK-293 (E), K562 (K) und HL-60 (H) dienten als Positiv- bzw. Negativkontrolle. Die im Western-Blot erhaltenen Ergebnisse wurden densitometrisch analysiert. (Abbildung 3.2) Die Signalintensität wurde auf den Proteingehalt der Proben an β -Actin, einem Strukturprotein, normiert. Die Werte sind anteilig zu dem Proteingehalt in HEK-293 Zellen angegeben, welcher willkürlich auf 1 gesetzt wurde.

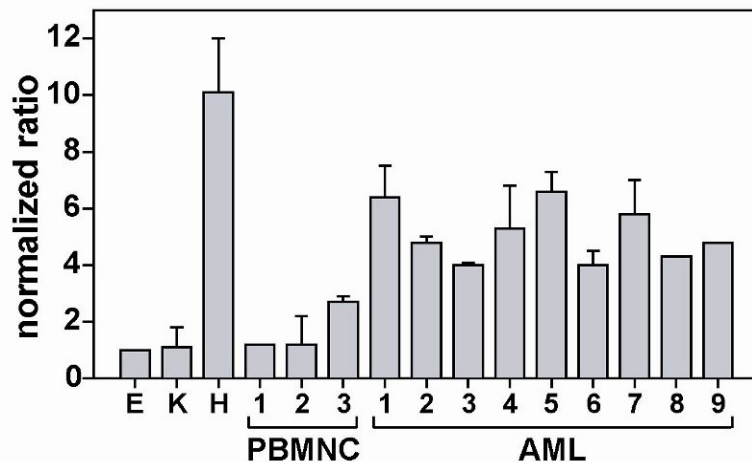


Abbildung 3.2: BCL2 wird in AML-Blasten in hohem Maße exprimiert. Densitometrisch bestimmtes Ausmaß der BCL2-Expression im Verhältnis zum β -Actin-Level. Ergebnisse auf Werte der Kontroll-Zelllinie HEK-293 normiert.

Aus diesen Experimenten konnte geschlossen werden, dass BCL2 verglichen mit PBMNC in AML-Proben in hohem Maße exprimiert wird. Insgesamt ergab sich eine im Mittel 3fache (von 2,3- bis 3,8fach) Erhöhung des BCL2-Proteins. Dieses Ergebnis ist statistisch signifikant ($P < 0,001$, two-sided t-test). Erstaunlicherweise zeigte BCL-xL keine statistisch signifikante Erhöhung der Signalintensität (im Mittel 1,42fach). In Proben mit FLT3-ITD-Mutationen war die BCL-xL-Expression im Vergleich zu den anderen Proben leicht, allerdings nicht statistisch signifikant (im Mittel 1,64fach) erhöht.

3.1.2 FLT3-Inhibition hat keinen Einfluss auf BCL2-Expression in AML-Zellen

Es stellte sich nun die Frage, ob die erhöhte Expression von BCL2 von der Aktivität und dem Phosphorylierungsstatus der FLT3-Kinase abhängig ist. Um das zu klären, wurde nach 36-stündiger Inkubation mit dem FLT3-Inhibitor SU5641 in Zusammenarbeit mit Kohl TM ein Western-Blot durchgeführt. Wie Abbildung 3.3 zeigt, hatte dies keine Verminderung der BCL-2-Expression zur Folge.

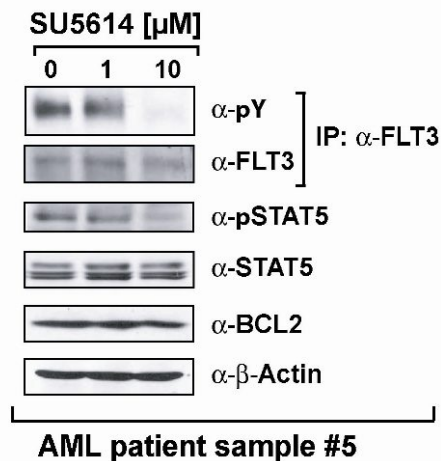


Abbildung 3.3: BCL2 wird in AML-Blasten unabhängig von der FLT3-Kinase-Aktivität exprimiert. Mononukleare Zellen der AML-Probe #5 wurden 36 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen des FLT3-Inhibitors SU5614 inkubiert. Die Graphik zeigt eine Dephosphorylierung von FLT3 und dessen Downstream-Target STAT5 ohne Beeinflussung der Expression von BCL2.

Es konnte somit gezeigt werden, dass BCL2 unabhängig von Aktivität und Phosphorylierungsstatus der FLT3-Kinase exprimiert wird. All diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass BCL2 eine möglicherweise eine Rolle in der Resistenzentwicklung gegen Chemotherapeutika und molekulare Inhibitoren bei der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie spielen könnte.

3.2 ABT-737 führt zu verbessertem Ansprechen auf FLT3-Inhibitor-Behandlung in AML-Zelllinien

Um diese Hypothese weiter zu untermauern, wurde der molekulare Inhibitor ABT-737, ein BH3-Mimetikum, in einem modifizierten Zelllinien-Modell der FLT3-positiven AML getestet. Es wurde bereits beschrieben, dass ABT-737 in der Lage ist, intrazelluläre Interaktionen der BCL2-Familie zu unterbinden, indem ABT-737 an die hydrophobe Bindungsstelle der Proteine bindet.³¹ ABT-737 bindet mit hoher Affinität an BCL2, BCL-xL und BCL-w, nicht aber an das weniger homologe Protein MCL1.

3.2.1 BCL2 sowie BCL-xL verleihen Ba/F3-Zellen Resistenz gegenüber SU5614

Es folgte die Etablierung eines Ba/F3-Zelllinien-Modells, in welchem BCL2 oder BCL-xL getrennt von einem anderen Plasmid exprimiert wurde, in welches eine FLT3-ITD-Mutation mittels pMSCV-Vektor transferiert wurde. Unsere Arbeitsgruppe und andere haben bereits beschrieben, dass IL-3-abhängige Ba/F3-Zellen durch eine konstitutiv aktivierte FLT3-Kinase faktorenunabhängig werden.^{24, 26} Folglich ahmte dieses Modell die in 3.1 beschriebene Situation in AML-Blasten nach; eine

Dephosphorylierung des FLT3-Rezeptors konnte nicht zu einer Downregulation der Expression von BCL2 führen. Diese Ba/F3-Zellen, welche zur FLT3-ITD-Mutation begleitend auch BCL2 oder BCL-xL in ihrem Genom trugen, zeigten im Apoptoseversuch eine Resistenz gegenüber dem Kinase-Inhibitor SU5614. Mock-transduzierte-Ba/F3-Zellen (ohne BCL2 oder BCL-xL) reagierten wie erwartet nach Inkubation mit SU5614 mit apoptotischem Zelltod. (Abbildung 3.4)

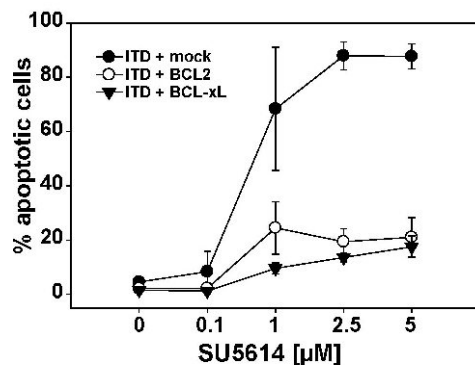


Abbildung 3.4: BCL2 oder BCL-xL verleiht Ba/F3-Zellen Resistenz gegenüber SU5614.

Ba/F3-Zellen wurden mit FLT3-ITD und BCL2 oder BCL-xL transduziert und mit steigenden Konzentrationen von SU5614 inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit AnnexinV-PE und 7-AAD und Annexin-Puffer behandelt und anschließend zytometrisch analysiert. Eine Resistenzentwicklung bei BCL2 bzw. Bcl-xl tragenden Ba/F3-Zellen ist ersichtlich.

3.2.2 Inhibition von BCL2 stellt die Empfindlichkeit gegenüber FLT3-Inhibitor-Behandlung im Ba/F3-Zelllinien-Modell wieder her

Um diese Resistenzentwicklung aufzuheben, wurde SU5614 mit dem beschriebenen BH3-Mimetikum ABT-737 kombiniert. Die Kombinationsversuche ergaben, dass apoptotischer Zelltod in Ba/F3-Zellen, welche FLT3-ITD und BCL2 stabil exprimierten, bereits bei sehr geringen Dosen von ABT-737 eintrat ($IC_{50} = 0,1 \mu M$). Bei Ba/F3-Zellen, welche FLT3-ITD und BCL-xL trugen, wurden höhere Dosen von ABT-737 benötigt ($IC_{50} = 1,0 \mu M$). Die Spezifität von ABT-737 konnte bewiesen werden, indem alle Versuche parallel mit einem funktionslosen Enantiomer von ABT-737 (ABT-CTRL) durchgeführt wurden. (Tabelle 3)

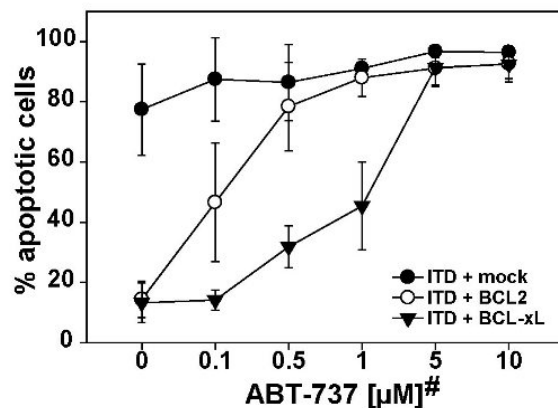


Abbildung 3.5: Inhibition von BCL2 stellt die Empfindlichkeit gegenüber FLT3-Inhibitor-Behandlung in AML-Zelllinien-Modell wieder her.

Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen des BCL2-Inhibitors ABT-737 in Kombination mit SU5614. (# = 1 μM SU5614 wurde zugegeben)

	IC ₅₀ [μM]		
	SU5614	ABT-737 [#]	ABT-CTRL [#]
ITD + mock	0.50	N/A	N/A
ITD + BCL2	>10	0.10	1.5
ITD + BCL-xL	>10	1.0	7.3

[#] + SU5614 1μM

Tabelle 3 : Inhibition von BCL2 stellt die Empfindlichkeit gegenüber FLT3-Inhibitor-Behandlung in AML-Zelllinien-Modell wieder her.

IC₅₀-Werte für die Behandlung mit SU5614, ABT-737 und ABT-CTRL. Die Kombination aus SU5614 und ABT-737 induzierte apoptotischen Zelltod in modifiziertem Ba/F3-Zellmodell (Co-Expression von FLT3-ITD und BCL2 oder BCL-xL). ABT-CTRL zeigte keine signifikanten Effekte. Für ITD+mock transduzierte Zellen kann keine IC₅₀ ermittelt werden, da diese bereits bei alleiniger Behandlung mit SU5614 apoptotischen Zelltod zeigten.

3.2.3 Behandlung mit ABT-737 führt in Ba/F3-Zellen zu erhöhter Expression von Caspase-3-Spaltprodukten

Als nächstes wurde die Fähigkeit von ABT-737 analysiert, Caspase-3-Spaltprodukte zu induzieren. Caspase-3 ist ein proapoptotisches Protein, dessen Spaltprodukte zu apoptotischem Zelltod führen. Für die Analyse wurden Ba/F3-Zellen mit SU5614 (1 μM), ABT-737 (0,1 μM) und ABT-CTRL (0,1 μM) sowie mit Kombinationen aus SU5614 und ABT-737 bzw. ABT-CTRL für 16 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen in modifiziertem RIPA-Puffer lysiert und auf den Gehalt an Caspase-3-Spaltprodukten untersucht. (Abbildung 3.6)

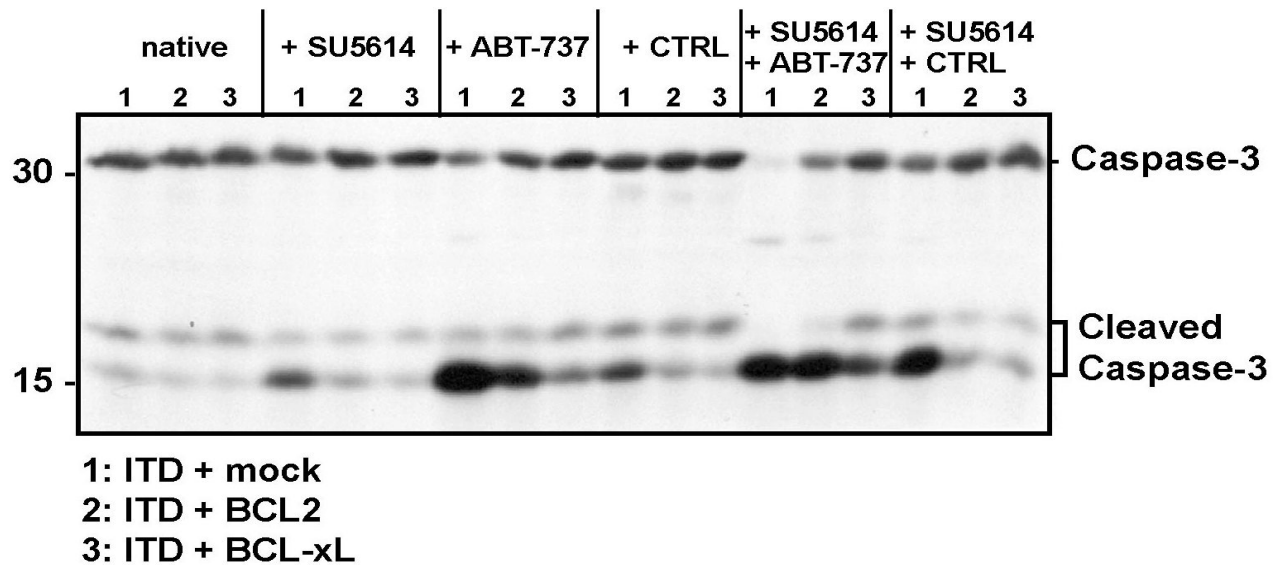


Abbildung 3.6: Inhibierung von BCL2 führt in Ba/F3-Zelllinien-Modell zu Apoptose bei FLT3-Inhibitor-Behandlung.

Transduzierte Ba/F3-Zellen wurden mit SU5614, ABT-737 und ABT-CTRL oder Kombinationen daraus für 16 Stunden inkubiert, anschließend lysiert und auf Caspase-3-Spaltprodukte analysiert. Es wurde eine Bande kompletter Caspase-3 (~30 kD) und zwei Banden von Caspase-Fragmenten (17 und 19 kD) detektiert.

Unbehandelte (native) Zellen zeigten einen niedrigen Gehalt an Caspase-3-Spaltprodukten mit einem Molekulargewicht von 17 und 19 kDa. Die ausschließliche Behandlung der Zellen mit SU5614 führte nur bei mock-transduzierten FLT3-ITD-Zellen zu einem Anstieg, wobei alle Zelllinien unter Behandlung mit ABT-737, nicht aber mit dessen funktionslosem Enantiomer ABT-CTRL, eine Erhöhung des Levels der Caspase-3-Spaltprodukte zeigten. Wie aus Abbildung 3.6 ersichtlich, ergab sich der höchste Anstieg im Kombinationsansatz mit SU5614 und ABT-737.

Zusammenfassend gelang es durch diese Versuche zu zeigen, dass das BH3-Mimetikum ABT-737 in Ba/F3-Zellen mit FLT-ITD-Mutation und ekto exprimiertem BCL2 oder BCL-xL die Resistenzentwicklung gegen FLT3-Inhibitor-Behandlung aufheben kann und – in Kombination mit SU5614 angewandt – Apoptose induziert.

3.3 ABT-737 induziert Apoptose in AML-Zelllinien

Als nächstes wurden die Ergebnisse der Experimente mit Ba/F3-Zellen in humanen leukämischen Zelllinien bestätigt. Hierzu wurden diverse Zelllinien von CML- (K-562, KCL-22), ALL- (SD-1) und AML-Patienten (HL-60, Kasumi-1, MV4-11, MOLM-13) hinsichtlich ihres Ansprechens auf eine Behandlung mit ABT-737 getestet. In Anlehnung an die Ergebnisse mit Ba/F3-Zellen zeigten alle AML-Zelllinien ein Ansprechen auf ABT-737 im submikromolaren Dosisbereich. (Tabelle 4)

	Disease background	BCR-ABL	FLT3 mutation	IC ₅₀ [nM]	
				ABT-737	ABT-CTRL
K-562	CML	p210	–	2300	>10000
KCL-22	CML	p210	–	2200	>10000
SD-1	B-ALL	p190	–	850	8000
HL-60	AML	–	–	85	2500
Kasumi-1	AML	–	–	68	1500
MV4-11	AML	–	LM	40	1200
MOLM-13	AML	–	LM	20	800

Tabelle 4: Effekte der BCL2-Inhibition in humanen leukämischen Zelllinien.

Zusammenfassende Darstellung der in dieser Arbeit getesteten Zelllinien und ihr Ansprechen auf Behandlung mit ABT-737 bzw. ABT-CTRL. BCR-ABL tragende Zelllinien zeigten sich resistent im Gegensatz zu den vier AML-Zelllinien, welche eine sehr niedrige IC₅₀ aufwiesen.

Erneut wurde in Zusammenarbeit mit T. Kohl ein Western-Blot durchgeführt, um die Expression der anti-apoptotischen Proteine der BCL2-Familie in den getesteten AML-Zelllinien darzustellen. Auffallend waren die hohen Expressionslevel von BCL2 in den AML-Zelllinien, welche am sensibelsten auf eine ABT-737-Inhibitor-Behandlung reagiert hatten: HL-60, MV4-11 und MOLM-13. Diese sind vergleichbar mit Leveln in HEK-293 Zellen, in welche cDNA für menschliches BCL2 mittels pMSCV-Vektor unter Kontrolle eines retroviralen Promotors transferiert worden war. (Abbildung 3.7) Im Gegensatz dazu war das Expressionsniveau von BCL-xl in MV4-11-Zellen sehr niedrig und in HL-60-, Kasumi-1- und MOLM-13-Zellen kaum nachweisbar.

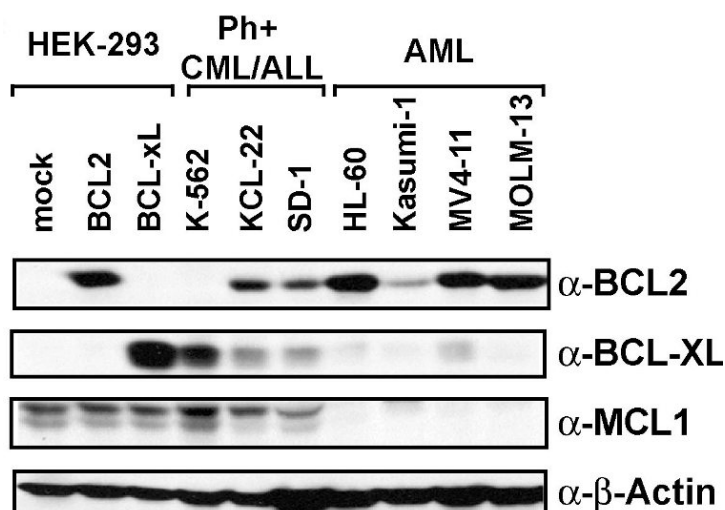


Abbildung 3.7: Western-Blot zur Darstellung der Expressionslevel der anti-apoptotischen Proteine der BCL2-Familie.

Auffallend hohe Expressionslevel an BCL2 bei den AML-Zelllinien MV4-11, MOLM-13 und HL-60. Als Kontrolle diente das Expressionslevel von β-Actin.

3.3.1 Behandlung mit ABT-737 führt in AML-Zelllinien zu erhöhter Expression von Caspase-3-Spaltprodukten

Analog zu den Versuchen mit Ba/F3-Zellen wurde die Expression von Caspase-3 analysiert. Es zeigte sich erneut eine Abhängigkeit der Aktivität von ABT-737 vom Grad der Aktivierung dieses pro-apoptotischen Proteins. Nach vierstündiger Inkubation von MOLM-13-Zellen mit ABT-737 (0,1 μ M) konnten Caspase-Spaltprodukte nachgewiesen werden. Demhingegen war nicht so bei der Behandlung von KCL-22-Zellen nach selbigen Procedere (Abbildung 3.8). Vergleichend induzierte das Chemotherapeutikum AraC sowohl in MOLM13 als auch in KCL-22-Zellen Apoptose (Daten nicht gezeigt).

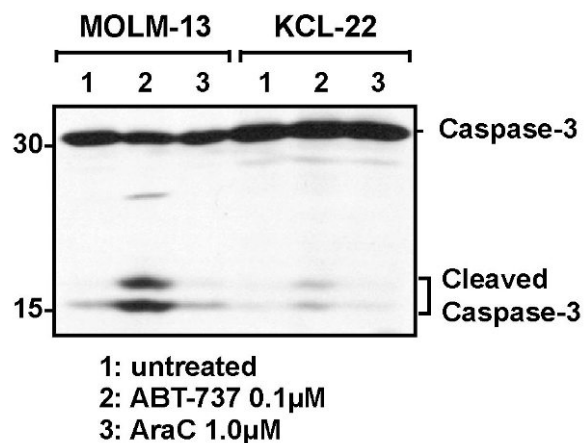


Abbildung 3.8: Analyse der Caspase-Aktivität in AML-Zelllinie MOLM-13 und CML-Zelllinie KCL-22 nach Behandlung mit ABT-737 bzw. Cytarabin (AraC).

Die Zelllinien wurden für vier Stunden mit den jeweils angegebenen Konzentrationen von ABT-737 bzw. AraC inkubiert, anschließend lysiert und auf Caspase-3 analysiert. ABT-737 induzierte nur in MOLM-13-Zellen eine Aktivitätszunahme von Caspase-3, nicht jedoch in KCL-22-Zellen.

3.3.2 ABT-737 induziert Apoptose in AML-Zelllinien, nicht aber in BCR-ABL-positiven Zellen

Überraschenderweise zeigten alle Zelllinien, welche das Philadelphia-Chromosom (Ph⁺) trugen, eine Resistenz gegenüber ABT-737. Die IC₅₀-Werte, welche sich für die CML-Zelllinien K-562 (Ph⁺) und KCL-22 (Ph⁺) ergaben, fielen gemittelt um ein 40faches höher aus als die der AML-Zelllinien. Die ebenfalls das Philadelphia-Chromosom tragende ALL-Zelllinie SD-1 zeigte eine durchschnittlich 16fach höhere IC₅₀ bei Behandlung mit ABT-737, wiederum verglichen mit den sensiblen AML-Zelllinien. (vergleiche hierzu Tabelle 4) Aus Abbildung 3.8 wird ersichtlich, dass eine Inkubation der KCL-22 Zellen mit ABT-737 zu keiner signifikanten Caspase-3-Aktivitäts-Erhöhung führte. Hier stellte sich nun die Frage, warum diese Zelllinien trotz moderater BCL2-Expression (siehe Abbildung 3.7) scheinbar resistent gegenüber dem BH3-Mimetikum ABT-737 waren.

3.3.3 MCL1 wird in BCR-ABL-positiven Zellen in hohem Maße exprimiert

Eine mögliche Erklärung für diesen Resistenzmechanismus könnte das anti-apoptotische Protein MCL1 (*myeloid-cell-leukemia-1*) darstellen. MCL1 ist ein Mitglied der BCL2-Familie und wurde als downstream target von BCR-ABL beschrieben.³² Es wurde gezeigt, dass MCL-1 vermittelt durch seine BH3-Domäne Heterodimere mit BAX und BAK (beide sind BCL2-Familienmitglieder, welche eine entscheidende Rolle in der Caspase-Aktivierung und Cytochrom-C-Ausschüttung spielen) ausbilden kann.^{33,34} MCL-1 wäre somit in der Lage, der Inhibition von BCL2 und BCL-xL entgegenzuwirken und Apoptose zu verhindern. Diese Vermutung wird durch die in Abbildung 3.7 dargestellten Ergebnisse gestützt, welche belegen, dass MCL-1 in nativen HEK-293-Zellen und in Ph+-Zellen in hohem Maße exprimiert wurde, nicht jedoch in den auf BCL2-Inhibitor-Behandlung ansprechenden AML-Zelllinien.

3.4 BCL2-Inhibition führt spezifisch zu Apoptose in primären AML-Blasten

Nachdem BCL2 als wichtiger Regulator der Resistenzentwicklung identifiziert worden war, stellte sich die Frage, ob eine Hemmung von BCL2 in vitro zu apoptotischem Zelltod in AML-Blasten von primären Patientenproben führen könnte. Hierzu wurden verschiedene AML-Proben (siehe Tabelle 1) für 24 Stunden mit ansteigenden Konzentrationen von ABT-737 bzw. ABT-CTRL inkubiert. Beispielhaft sind in Abbildung 3.9A und 3.9B die Ergebnisse der AML-Proben 1# und 2# dargestellt.

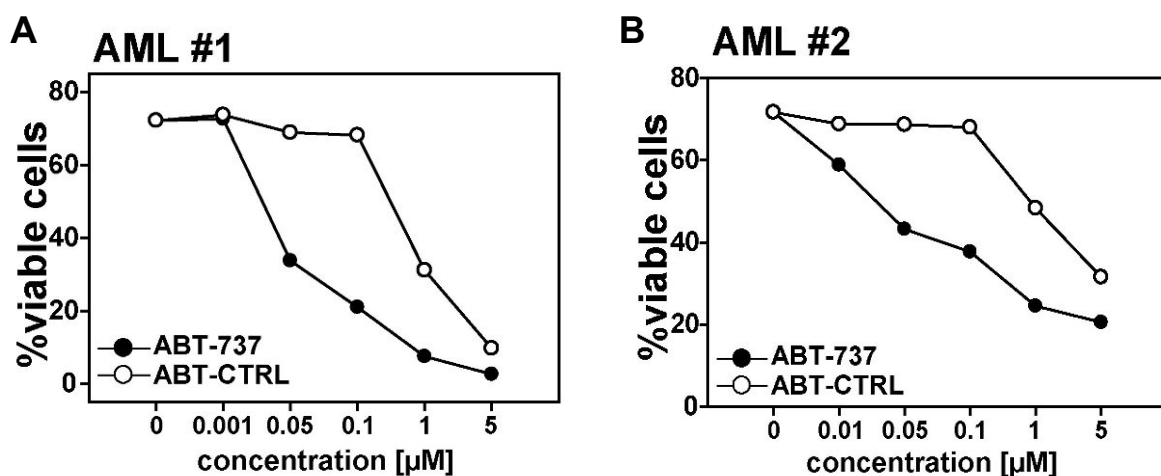


Abbildung 3.9A und B: ABT-737 induziert apoptotischen Zelltod in AML-Blasten.

AML-Probe #1 sowie AML-Probe 2# wurden jeweils für 24 Stunden mit ABT-737 bzw. ABT-CTRL inkubiert. In beiden Ansätzen zeigt sich eine Effektivität von ABT-737 im submikromolaren Dosisbereich.

Es wird ersichtlich, dass ähnlich den Versuchen mit AML-Zelllinien (Tabelle 4) auch bei AML-Blasten submikromolare Dosen von ABT-737 ausreichen, um apoptotischen Zelltod zu induzieren. Das funktionslose Enantiomer ABT-CTRL zeigte in diesem Dosisbereich bis 0,1 μM keine Effektivität.

Zur weiteren Untermauerung dieser Ergebnisse schlossen sich an die Apoptose-Versuche weitere durchflusszytometrische Messungen an. Unbehandelte und mit ABT-737 (in den angegebenen Konzentrationen) behandelte Zellen wurden mit Annexin-V und 7-AAD (*Aminoaktinomycin*) gefärbt und anschließend gemessen. In Abbildung 3.10A und 3.10B ist wiederum das exemplarische Ergebnis für die Blasten des Patienten #1 und 2# aufgezeigt. Auch hieraus wird deutlich, dass sich mit ansteigenden Konzentrationen von ABT-737 das Verhältnis von viablen zu spätapoptotischen Zellen in Richtung der letzteren verschiebt.

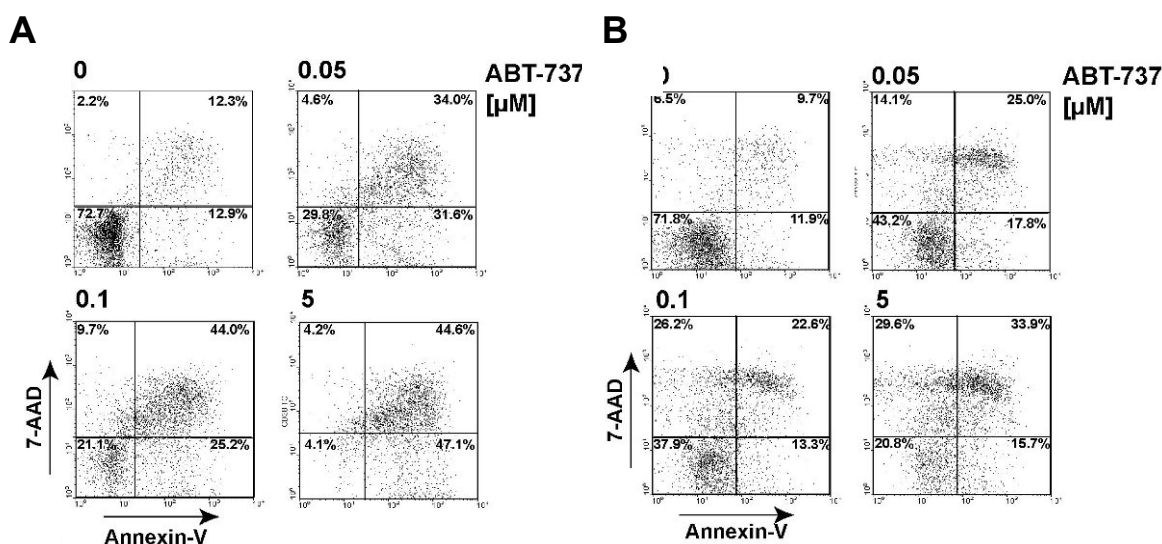


Abbildung 3.10A und B: ABT-737 induziert Apoptose in AML-Blasten.

Repräsentativer Dot-Plot der durchflusszytometrischen Messung einer Annexin-V-PE- und 7-AAD-Färbung nach vorausgegangener Behandlung von AML-Blasten mit ABT-737 für 24 Stunden.

(A) AML-Blasten #1: mit ansteigender Konzentration von ABT-737 (0-5 μM) steigt der Anteil an spätapoptotischen Zellen. (B) AML-Blasten #2: analoges Ergebnis zu (A).

Um die Heterogenität der zur Verfügung gestandenen Proben (Tabelle 1) zu kompensieren, wurde ein Wertesystem eingeführt, welches die spezifische Toxizität von ABT-737 beschreibt. Ausgehend von der Toxizität von ABT-CTRL, welche als „%nonspecific activity“ gekennzeichnet wurde, dienen diese Werte als ein Maß des vertikalen Abstandes zwischen den Kurven, welche sich aus der Behandlung mit ABT-737 und ABT-CTRL ergeben hatten. (vergleiche Abb. 3.9) Je kleiner der Wert in

diesem System, um so höher die toxische Spezifität. Die Werte lagen zwischen 2,7 und 7,1 für die getesteten Proben. Bei einer der Proben (AML#6) standen sowohl Zellen aus peripherem Blut als auch Knochenmarkszellen zur Testung zur Verfügung. In der Apoptoseinduktion zeigte sich hier kein Unterschied. Als Negativkontrolle für diese Versuchsreihe dienten PBMNC von gesunden Spendern, welche sich bei der Behandlung mit ABT-737 durch höhere IC₅₀-Werte auszeichneten. Auch die „nonspecific-activity“ lag mit Werten zwischen 8,5 und 13,1 höher als bei den getesteten leukämischen Zellen. Zusammenfassend wird aus Tabelle 5 ersichtlich, dass das BH3-Mimetikum ABT-737, bei AML-Zellen eingesetzt in signifikanter Weise effektiver war, als bei PBMNC von gesunden Kontrollen. (p = 0,0017).

	Sample type	%Viability after 24h	IC ₅₀ ABT-737	IC ₅₀ ABT-CTRL	%nonspecific activity
AML #1	PB	72.1	45	750	6.0
AML #2	BM	71.8	160	3700	4.3
AML #3	BM	54.9	120	n.d.	N/A
AML #4	PB	N/A*	240	n.d.	N/A
AML #5	BM	51.6	70	980	7.1
AML #6	PB	69.8	130	3400	3.8
	BM	68.3	120	3300	3.6
AML #7	BM	<50.0	n.d.	n.d.	N/A
AML #8	PB	N/A*	25	750	3.3
AML #9	BM	N/A*	38	1400	2.7
AML #10	BM	<50.0	n.d.	n.d.	N/A
AML #11	BM	N/A*	240	2500	9.6
AML #12	BM	N/A*	50	4500	1.1
AML #13	BM	N/A*	400	5000	8.0
Donor #1	PB	68.9	170	1300	13.1
Donor #2	PB	72.2	450	3700	12.2
	PHA	67.0	>10000	>10000	N/A
Donor #3	PB	81.9	870	10200	8.5
	PHA	62.5	9500	>10000	N/A

Tabelle 5: Zusammenfassende Darstellung der Effekte von ABT-737 bzw. ABT-CTRL.

Aufgelistet nach der Proben-Herkunft (PB = peripheres Blut, BM = Knochenmark, PHA = vorangegangene PHA-Stimulation), der Viabilität der Zellen nach 24 Stunden ohne Inhibitor-Behandlung, IC₅₀-Werte für ABT-737- bzw. ABT-CTRL-Behandlung, nonspecific-activity.

Legende: * = Auszählung im Proliferationsansatz; N/A = nicht zur Verfügung; n. d. = nicht bestimmt

3.4.1 Aktivierte T-Lymphozyten sind resistent gegen ABT-737

Im Weiteren galt es zu beurteilen, inwieweit ABT-737 auf normale Lymphozyten toxisch wirkt. Hierfür wurden PBMNC für vier Tage mit PHA (*Phytohämagglutinin*), welches das Wachstum von T-Zellen stimuliert, inkubiert. Nach dieser Behandlung stand eine Mehrzahl von aktivierten T-Lymphozyten zur Verfügung; 60,1 % exprimierten CD3 und CD38 auf ihrer Zelloberfläche. Diese aktivierten T-

Lymphozyten waren auch bei der Behandlung mit hohen Konzentrationen resistent gegen ABT-737. (vergleiche Abbildung 3.11 und Tabelle 5)

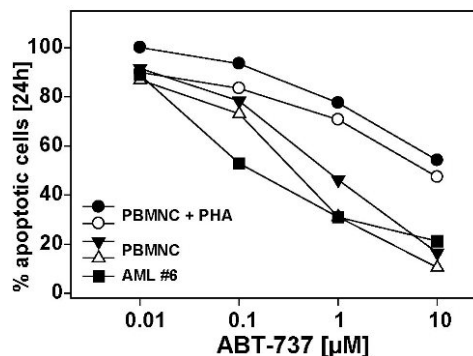


Abbildung 3.11: Aktivierte T-Lymphozyten sind resistent gegen ABT-737. PBMNCs ohne und nach erfolgter Stimulation mit PHA sowie die AML-Zelllinie #6 wurden für 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von ABT-737 inkubiert und anschließend auf apoptotischen Zelltod analysiert.

3.4.2 Aktivierte T-Lymphozyten zeigen eine hohe Proteinexpression von MCL1

Um den zugrundeliegenden Mechanismus für diese Resistenzentwicklung zu untersuchen, wurde auch in diesen Zellen in Zusammenarbeit mit T. Kohl das Maß der MCL1-Expression bestimmt. In Abbildung 3.9 wurde bereits verdeutlicht, dass MCL1 bei Behandlung mit ABT-737 der Apoptoseinduktion entgegenwirken kann. Es lag somit die Mutmaßung nahe, dass dies auch hier der Grund für eine Resistenzentwicklung sein könnte. Interessanterweise zeigten die PHA-stimulierten Lymphozyten ein hohes Maß an MCL1; vergleichbar mit der Proteinexpression in K-562-Zellen, welche als Positivkontrolle dienten. (Abbildung 3.12)

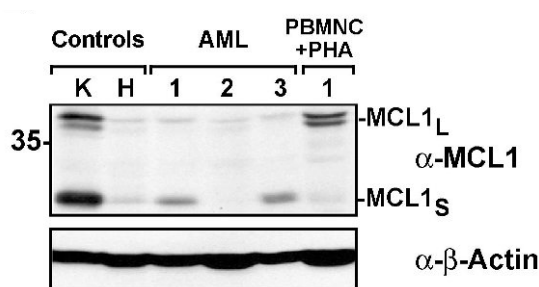


Abbildung 3.12: Proteinexpressionslevel von MCL1. Die AML-Zelllinien 1#–3#, PBMNCs nach PHA-Stimulation sowie die Kontrollzelllinien (K, K562; H, HL-60) wurden auf die Proteinexpressionslevel von MCL1L (volle Länge) und MCL1S (kurze Form) untersucht.

Aus Abbildung 3.14 wird ebenfalls ersichtlich, dass die AML-Proben 1#–3# ein sehr geringes Expressionslevel an MCL1 aufwiesen. Dieses Ergebnis erklärt das überdurchschnittliche Ansprechen auf die BCL2-Inhibition mit ABT-737 dieser Zellen. Eine zusammenfassende Darstellung des Verhältnisses von MCL1L bzw. MCL1S zu β -Aktin zeigt anschaulich die Unterschiede der Proteinlevel in PBMNC (mit und ohne Stimulation), AML-Zelllinien und Kontrollzelllinien. (Abbildung 3.13)

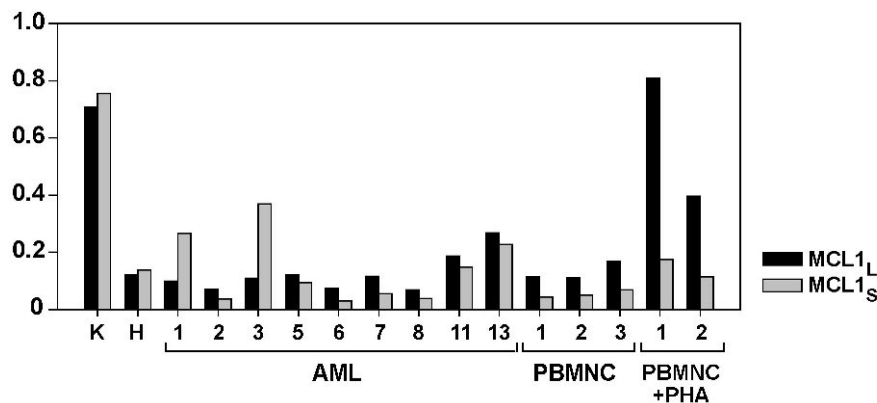


Abbildung 3.13: Densitometrische Messung der Proteinexpressionslevel von MCL1. Dargestellt ist das Verhältnis von MCL1 zu β -Aktin in PBMNC (mit und ohne Stimulation mit PHA), AML-Zelllinien und Kontrollzelllinien (K, K562; H, HL-60).

3.5 *BCL2-Inhibition wirkt synergistisch zu FLT3-Inhibitor-Behandlung*

3.5.1 Die Kombination von ABT-737 und SU5614 zeigt bei Behandlung von AML-Zelllinien mit FLT3-ITD synergistischen Effekt

Zu Beginn dieser Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass die BCL2-Expression in primären AML-Zellen unabhängig vom Aktivitätsstatus des FLT3-Rezeptors ist. (vergleiche Abbildung 3.3) Auf dieses Ergebnis gestützt wurde argumentiert, dass eine kombinierte BCL2-Inhibition und FLT3-Dephosphorylsierung zu einer übermäßigen Toxizität in Zellen, welche sowohl eine FLT3-Mutation als auch eine BCL2-Überexpression tragen, führen würde. Es gelang, diese Hypothese durch Experimente mit MOLM-13 und MV4-11 Zellen zu stützen. Hierbei handelt es sich um AML-Zelllinien, welche die beschriebenen Kriterien, sprich eine FLT3-ITD gepaart mit einer hohen BCL2-Expression, erfüllen. (vergleiche Abbildung 3.7) Beide Zelllinien wurden mit steigenden Konzentrationen von SU5614 sowohl mit als auch ohne Kombination mit ABT-737 (0,01 μ M) inkubiert. ABT-737 alleine zeigte keine Toxizität. Im two-sided paired t-test ($p < 0,05$) konnte für beide Zelllinien ein Synergismus der Behandlung mit dem BH3-Mimetikum ABT-737 und dem FLT3-Inhibitor SU5614 nachgewiesen werden. (Abbildung 3.14A und B)

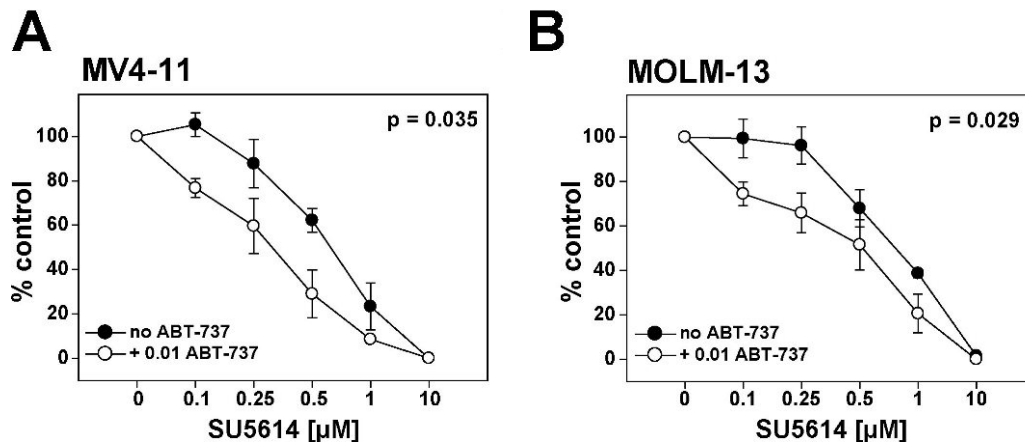


Abbildung 3.14A und B: Behandlung mit ABT-737 und FLT3-Inhibitor SU5614 ist synergistisch in Zellen mit FLT3-Mutation. MV4-11 und MOLM-13 (beide haben eine FLT3-ITD) wurden mit ansteigenden Konzentrationen von SU5614 in Kombination mit oder ohne ABT-737 (0,01 μ M) für 72 Stunden inkubiert und anschließend nach Trypan Blau Färbung ausgezählt. Eine alleinige Behandlung mit ABT-737 (0,01 μ M) zeigte keine signifikante Toxizität.

3.5.2 FLT3-Inhibitor-Behandlung führt zu Induktion von BIM

Eine mögliche Erklärung für den festgestellten Synergismus könnte die Upregulation von BIM, einem proapoptotischen Protein, liegen. BIM wurde bereits eine entscheidende Rolle in der Apoptose-Induktion bei Behandlung mit Imatinib zugeschrieben.³⁵ Um zu beweisen, dass es auch in unseren Experimenten bei einer RTK-Inhibitor-Behandlung zu einer Heraufregulation von BIM kommt, wurden in Zusammenarbeit mit T. Kohl unbehandelte und behandelte Zelllinien auf ihr Expressionslevel dieses proapoptotischen Proteins untersucht. Abbildung 3.15 zeigt einen deutlichen Anstieg des Expressionslevels von BIM nach 24-stündiger FLT3-Inhibitor-Behandlung bei MOLM-13-Zellen.

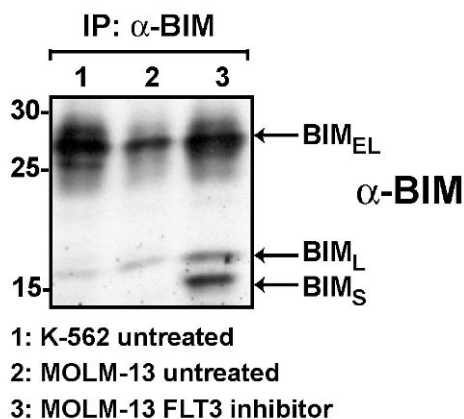


Abbildung 3.15: Induktion des proapoptotischen Proteins BIM nach FLT3-Inhibitor-Behandlung. MOLM-13-Zellen wurden für 24 Stunden mit einem FLT3-Inhibitor inkubiert, anschließend lysiert, unter Verwendung eines α -BIM-Antikörpers immunopräzipitiert und mittels Western-Blot analysiert. Es zeigte sich ein Anstieg in der Expression von BIM.

3.5.3 Die Kombination von ABT-737 und SU5614 zeigt bei Behandlung von primären AML-Proben einen synergistischen Effekt

Nachdem ein Synergismus für die Behandlung des BCL2-Inhibitors ABT-737 und den FLT3-Inhibitor SU5614 bei Zelllinien gezeigt werden konnte, sollten diese Ergebnisse auch bei der Behandlung von primären Zellen verifiziert werden. Hierzu wurden AML-Proben mit aufsteigenden Dosierungen von SU5614 in Kombination mit ABT-737 (0; 0,01 oder 0,025 μM) behandelt. Zusätzlich wurde eine analoge Ansatzreihe durchgeführt, bei der SU5614 durch das besser wasserlösliche Sunitinib ersetzt wurde. Die Ergebnisse sind graphisch in den Abbildungen 3.16A-C dargestellt.

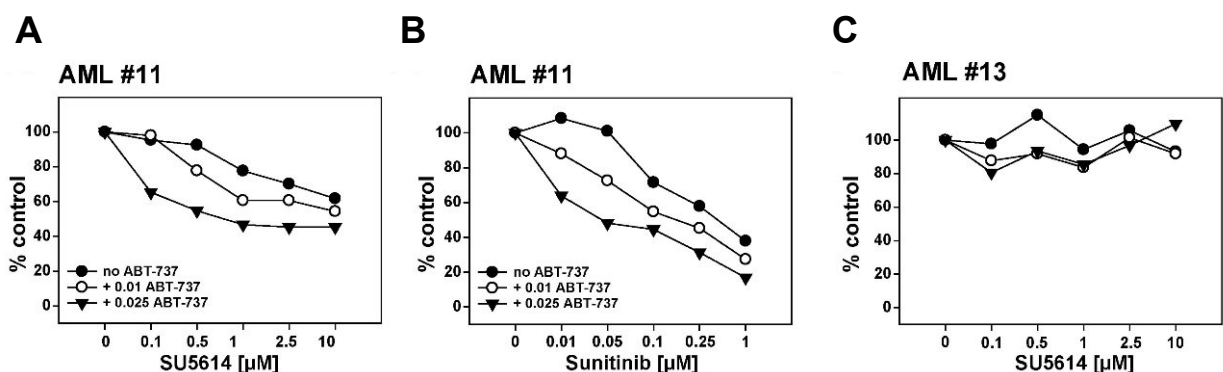


Abbildung 3.16A-C: Kombination von FLT3-Inhibitor-Behandlung und ABT-737 zeigt bei AML-Proben einen synergistischen Effekt.

(A): Die AML-Probe 11#, welche eine FLT3-ITD trägt, wurde für 72 Stunden mit einer Kombination aus SU5614 und ABT-737 (für 48 Stunden in den angegebenen Konzentrationen) behandelt, anschließend nach Trypan-Blau-Färbung ausgezählt.

(B): Analoges Ansatz zu A; anstelle von SU5614 wurde das besser wasserlösliche Sunitinib verwendet.

(C): Analoges Ansatz zu A; anstelle der AML-Probe 11# wurde AML 13# verwandt, welche einen FLT3-WT Genotyp aufweist.

Wie bei den Versuchen mit AML-Zelllinien gelang es auch hier, einen Synergismus von BCL2-Inhibitor und FLT3-Inhibitor bei allen AML-Proben mit FLT3-Mutation zu zeigen. Abbildung 3.18B verdeutlicht, dass eine Kombination des FLT3-Inhibitors Sunitinib, welcher sich bereits in klinischen Phase-I-Studien befindet,^{36,37} mit sehr geringen Dosen von ABT-737 zu fast vollständigem Zelltod bei AML-Proben mit FLT3-Mutation führte. Die quantitative Beziehung von Dosis und Wirkung wurde nach Chou und Talalay³⁸ berechnet und als Ci-Werte in Tabelle 6 dargestellt.

	Ci at				ABT-737 [μM]
	SU5614		Sunitinib		
	+ 0.01	+ 0.025	+ 0.01	+ 0.025	
AML #3	0.26	0.40	0.48	0.51	
AML #11	0.59	0.37	0.56	0.41	
AML #12	0.51	0.55	n.d.	n.d.	
AML #13	N/A	N/A	n.d.	n.d.	

Tabelle 6: Quantitative Darstellung von Dosis und Wirkung nach Chou und Talalay.

Ein Ci-Wert kleiner 1 bedeutet Synergismus, ein Ci-Wert größer 1 Antagonismus. Ein Wert gleich 1 deutet auf einen additiven Effekt hin.

4 Zusammenfassung und klinischer Aspekt

Das therapeutische targeting von FLT3 stellt einen vielversprechenden Ansatzpunkt in der Therapie der akuten myeloischen Leukämie dar. Allerdings zeigen spezifische FLT3 Tyrosinkinaseinhibitoren (PTK) - im Gegensatz zu ihrer Effektivität in Zelllinien - in vivo als alleiniges Agens nur geringe klinische Erfolge bei Patienten mit AML. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression antiapoptotischer Proteine der BCL2-Familie in einem hämatopoetischen Zelllinienmodell mit FLT3 Mutation eine Resistenz gegenüber FLT3 Inhibitoren induziert. Die Empfindlichkeit gegenüber FLT3 Inhibitoren konnte in dem Zelllinienmodell durch eine vorhergehende Behandlung mittels ABT-737, einem BH3 Mimetikum, wieder hergestellt werden. Die in dieser Studie getesteten primären AML Blasten zeigten eine hohe Expression von BCL2, nicht aber von BCL-xl oder MCL1. Die Proteinlevel von BCL2 waren nach Dephosphorylierung von FLT3 und dessen downstream target STAT5 nicht reduziert. Interessanterweise induzierte eine solitäre Behandlung primärer AML Blasten mit ABT-737 apoptotischen Zelltod. Auch humane, eine FLT3 Mutation tragende AML Zelllinien sprachen auf eine Behandlung mit ABT-737 in submikromolaren Dosen an. Im Gegensatz hierzu zeigten sich BCR-ABL transformierte Zelllinien resistent gegenüber das BH3-Mimetikum, ein Effekt welcher evtl. in der Induktion von MCL1 durch BCR-ABL bedingt sein könnte.

Diese Arbeit soll belegen, dass die Inhibition von antiapoptotischen Proteinen, im speziellen von BCL2, zu einem erfolgreichen Weg in der Behandlung der AML führen könnte. Außerdem könnten die Ergebnisse dieser Studie dazu beitragen die Effektivität anderer molekularer therapeutischer Prinzipien, wie die Inhibition von konstitutiv aktiven Signalwegen, im besonderen der FLT3 Rezeptortyrosinkinase, zu verbessern.

5 Diskussion

5.1 *Wie kommt es zu Überexpression von BCL2 in AML-Zellen ?*

Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit ausführlich beschrieben, handelt es sich bei der AML um eine heterogene Erkrankung, welche multiple Resistenzen gegen Chemotherapeutika und spezifische Inhibitoren – z. B. RTK-Inhibitoren – aufweist. In den in dieser Arbeit dargestellten Experimenten hat sich das Onkoprotein BCL2 als ein vielversprechender Angriffspunkt in der Therapie von hämatologischen Erkrankungen herausgestellt. Alle von uns in dieser Arbeit getesteten AML-Proben zeigten eine hohe Expression von BCL2; im Gegensatz dazu wiesen die von uns analysierten Proben nur geringe Expressionslevel an BCL-xL und MCL1 auf. Eine weitere wichtige Feststellung dieser Arbeit war, dass eine FLT3-Dephosphorylisierung in primären AML-Zellen nicht mit einer Downregulation von BCL2 einhergeht. (Abbildung 3.3) Daraus konnte gefolgert werden, dass FLT3-Mutationen nicht für den Anstieg des Proteinlevels an BCL2 verantwortlich gemacht werden können.

Eine Veröffentlichung von Minami et al.³⁹ beschreibt ebenfalls diesen Sachverhalt. Darin konnte gezeigt werden, dass in 32D-Zellen (murine-myeloische Zellen) die Expression von FLT3-ITD-Mutationen zur Upregulation von BCL-xL, nicht aber von BCL2 führt. Umso mehr bestätigt dies die bedeutende Rolle von BCL2 als neuen Angriffspunkt in der Therapie der AML. Der Einfluss von BCL2 auf die Pathogenese der AML wird durch eine Studie von Jaiswal et al.⁴⁰ weiter untermauert. Den Autoren ist es in einem Mausmodell gelungen zu zeigen, dass eine ektope Expression von BCR-ABL in Kombination mit BCL2 keinen CML-Phänotyp, sondern eine AML induziert.

5.1.1 **Micro-RNAs als mögliche Gegenspieler zu BCL2**

Eine Frage bleibt jedoch bestehen: Weshalb kommt es in AML-Zellen zur Überexpression des anti-apoptotischen Proteins BCL2? Eine mögliche Erklärung könnte eine gestörte Aktivität von microRNAs (miR) sein.^{41 42} Diese bezeichnen eine neue Klasse von nicht-protein-kodierenden kleinen RNAs welchen bedeutende regulatorische Funktionen zugeschrieben werden. Verschiedene Studien belegen,

dass einige microRNAs Einfluss auf Zellproliferation und Apoptose-Prozesse in malignen Zellformationen ausüben.⁴³ Beispielsweise beschrieben Shimizu et al., dass sich in CLL-Zellen die Expression von miR-15 und miR-16 indirekt proportional zur Expression von BCL2 verhält.⁴⁴ Diese Beobachtung konnte auch auf eine Teilmenge von AML-Zellen übertragen werden.⁴⁵ In einem leukämischen Zelllinienmodell gelang es, durch Unterdrückung der BCL2-Expression durch microRNAs Apoptose zu induzieren. Wenn man miR-15 und miR-16 als natürliche Gegenspieler zu BCL2 betrachtet, ergibt sich daraus für die Zukunft ein neuer Angriffspunkt für die Therapie BCL2-überexprimierender Tumore.

5.1.2 Das Fusionsprotein AML-1/ETO induziert BCL2 Expression

Eine andere Erklärung auf die Frage, warum es in AML-Zellen zur Überexpression von BCL2 kommt, kann im Fusionsprotein AML-1/ETO gefunden werden. Hierbei handelt es sich um eine Fusion des auf Chromosom 21 lokalisierten AML1-Gens mit dem auf Chromosom 8 befindlichen ETO-Gens, welche bei der in der AML häufigen Translokation t(8;21) gefunden werden kann. Es wurde beschrieben, dass das AML-1/ETO-Gen, welches einen Transkriptionsfaktor codiert, zur Induktion von BCL2 führt.⁴⁶ Die eine Translokation t(8;21) aufweisenden Kasumi-1-Zellen zeigten auch in der hier präsentierten Arbeit eine BCL2-Expression. Aus Abbildung 3.9 wird jedoch ersichtlich, dass diese verglichen mit anderen nicht t(8;21) tragenden AML-Zelllinien nicht übermäßig ausgeprägt ist. Dennoch waren die Kasumi-1-Zellen sensibel auf eine BCL2-Inhibitor-Behandlung. (vergleiche Abbildung 3.7)

5.1.3 BCR-ABL führt zu Downregulation von BCL2

Während dieser Arbeit verlangte die Entdeckung, dass BCR-ABL-positive Zellen gegen BCL2-Inhibitor-Behandlung resistent zu sein scheinen, eine Erklärung. Diese sahen wir in der Überexpression des MCL1-Proteins, welche in allen BCR-ABL-positiven Zelllinien (K-562, KCL-22 und SD-1) nachgewiesen werden konnte. Dies deckt sich auch mit einer Publikation von Aichberger et al., in der gezeigt wurde, dass BCR-ABL zu einer verstärkten Promoter-Aktivität von MCL1 führt.³² Demgegenüber scheint BCL2 verzichtbar für BCR-ABL-positive Zellen zu sein, K-562 zeigte keine, SD-1 und KCL-22 nur sehr geringe Expressionslevel. (Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass es in BCR-ABL-exprimierenden HL-60-Zellen zu

einer ausgeprägten Downregulation von BCL2 sowie zu einer vermehrten Expression von BCL-xL kommt.)⁴⁸ Amarante-Mendes et al. zeigen, dass BCR-ABL-exprimierende HL-60-Zellen wesentlich resistenter gegen eine apoptose-induzierende Behandlung sind als BCL2- oder BCL-xL-exprimierende HL-60-Zellen. Sie stellen somit fest, dass BCR-ABL eine stärkere anti-apoptotische Aktivität induziert als die Expression von BCL2 oder BCL-xL.⁴⁷

5.1.4 In BCR-ABL-unabhängigen CML-Zellen ist Resistenz gegen STI-571 mit BCL2 Expressionslevel assoziiert

Dai et al. untersuchte in einem Zelllinienmodell den zugrundeliegenden Resistenzmechanismus der Therapie der CML mit STI-571.⁵⁰ In dieser Versuchsreihe zeigten im Vergleich zu K-562 und LAMA Zelllinien die BCR-ABL-unabhängigen und STI-571-resistenten Klone K-562-R und LAMA-R eine deutlich höhere BCL-2 Expression. Auch bei den Zelllinien K-562-R und LAMA-R führte eine Downregulation von BCL2, entweder durch Behandlung mit dem BH3-Mimetikum HA14-1 oder durch anti-sense Strategien, zu einer vermehrten Zelltodinduktion bei der Behandlung mit STI-571. Dai et al. konnte somit zeigen, dass in BCR-ABL-unabhängigen CML-Zelllinien die Resistenz gegen STI-571 mit dem Expressionslevel von BCL2 assoziiert ist.

5.2 Zusammenspiel der antiapoptotischen Proteine

5.2.1 Apoptotische Proteine in BCR-ABL-positiven Leukämien

Im Gegensatz zu AML-Zelllinien zeigten Zellen welche das Fusionsprotein BCR-ABL tragen, einen deutlich höheren Proteingehalt an MCL1 und BCL-xL. Diese anti-apoptotischen Proteine können auf verschieden Art und Weise Zelltod durch Zytochrom C Ausschüttung aus Mitochondrien verhindern.⁵¹ Wills et al. beschrieben, dass BCR-ABL-positive Leukämien eine Überexpression an MCL1 aufweisen.³⁴ Eine Verdrängung von BCL-xL von BAX und BAK würde die Induktion von Apoptose nicht erleichtern, da MCL1 noch immer ungehindert eine BAX und BAK Oligomerisation ermöglichen würde.

In der vorliegenden Arbeit gelang es zu zeigen, dass MCL1 Expression zu einer Resistenz gegen die Behandlung mit ABT-737 führt. Es gelang diese These anhand

von Ph+ Zelllinien sowie mit zuvor mit PHA stimulierten Zellen von gesunden Spendern zu veranschaulichen. (vergleiche Abbildung 3.12) PHA Stimulation führte zu einem deutlichen Anstieg in der MCL1 Expression, dieser Zusammenhang deckt sich auch mit den Ergebnissen von Molica et al.⁵² Mittels FACS Messungen fanden die Autoren dort hohe BCL2 Expressionen in B und T Lymphozyten. In Monozyten waren die BCL2-Expressionen signifikant geringer und fehlten völlig bei neutrophilen Granulozyten. Hieraus könnte ein Effekt der BCL2-Inhibition bei T- und B-Lymphozyten abgeleitet werden, allerdings sind diese Zellen wiederum durch die Aktivität von MCL1 vor apoptotischem Zelltod geschützt.

Folgende Abbildung soll schematisch die mutmaßlichen Zusammenhänge der antiapoptotischen Proteine in der BCR-ABL-positiven myeloischen Leukämie verdeutlichen.

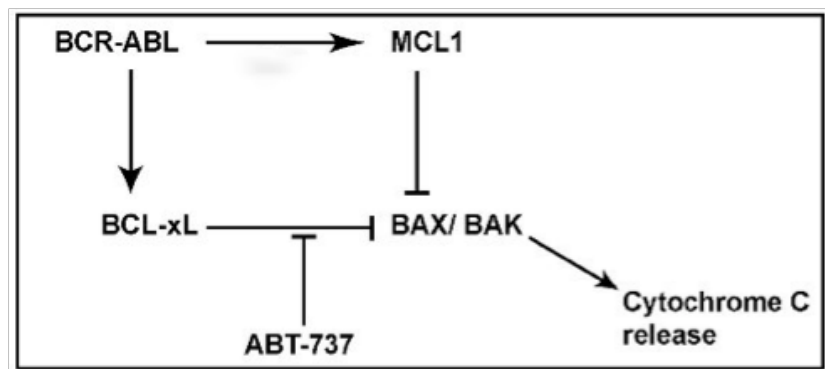


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Zusammenspiels der antiapoptotischen Proteine in der BCR-ABL-positiven Leukämie. Die Induktion von MCL1 durch BCR-ABL wurde von Jaiswal et al. beschrieben.⁴⁰

Aus Abbildung 4.1 geht hervor, dass ein alleiniges Unterdrücken der BAX/BAK-Aktivierung durch ein BH3-Mimetikum nicht ausreichend ist um Zelltod zu induzieren, da die MCL1-Aktivität durch ABT-737 nicht beeinflusst wird. Eine BAX/BAK-Oligomerisation ist also nach wie vor verhindert und somit auch eine zur Apoptose führende Zytocrom C Ausschüttung.

5.2.2 Apoptotische Proteine in Leukämien mit FLT-ITD

Die nachfolgende Abbildung stellt schematisch zusammenfassend, die nach dieser Arbeit mutmaßlichen Zusammenhänge der anti-apoptotischen Proteine der AML mit konstitutiv aktiviertem FLT3-Rezeptor und ihre gegenseitigen Interaktionen dar. Allerdings muss abschließend eingeräumt werden, dass noch nicht ausreichend

bekannt ist in wie weit und in welchem Ausmaß andere molekulare Zusammenhänge evtl. die Sensivität der BCL2 Inhibition beeinflussen.

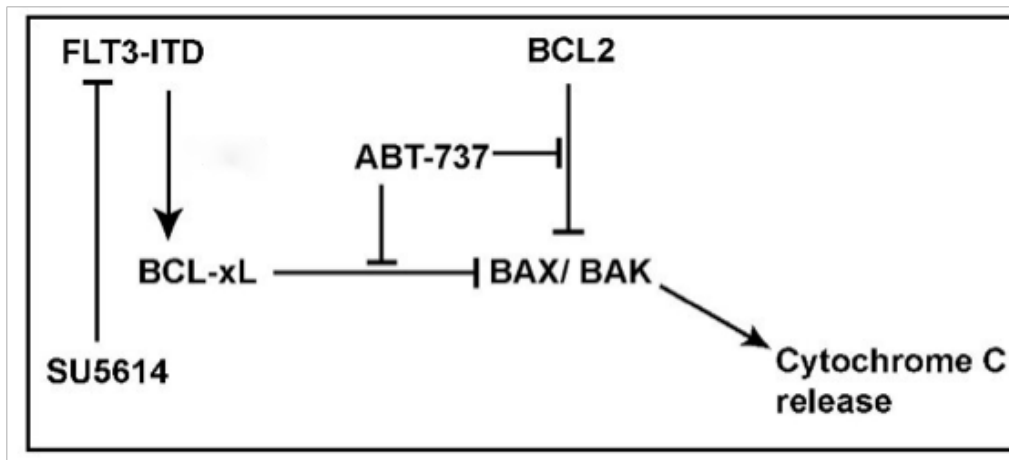


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Zusammenspiels der antiapoptotischen Proteine in der Leukämie mit konstitutiv aktiviertem FLT3 Rezeptor.

5.3 Präklinische Entwicklung von BCL2- Inhibitoren

Um das anti-apoptotische Potential des überexprimierten BCL2 zu inhibieren wurde in dieser Arbeit mit dem selektiven BH3-Mimetikum ABT-737 gearbeitet. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass eine solitäre Behandlung primärer AML Blasten mit ABT-737 apoptotischen Zelltod induzierte. Auch humane, eine FLT3 Mutation tragende AML-Zelllinien sprachen auf eine Behandlung mit ABT-737 in submikromolaren Dosen an. Analog zu den hier unter 3.4 dargestellten Ergebnissen konnte die Apoptoseinduktion des BCL2 Inhibitors auch von anderen Arbeitsgruppen wie beispielsweise Gandhi et al.⁷⁰ in CLL-Zelllinien sowie Böck et al.⁷¹ im Rahmen der Glioblastombehandlung dokumentiert werden. Die - aufgrund der für teilweise sehr unterschiedliche maligne Zellformationen bestätigte vorliegende Datenlage – verdeutlicht das mögliche zukünftige Potential der BCL2-Inhibition.

5.3.1 MCL1 Überexpression als Erklärung für Resistenz gegen BCL2 Inhibitoren

Im Gegensatz zu den in 5.3. erwähnten AML-Blasten zeigten sich BCR-ABL transformierte Zelllinien resistent gegenüber eine solitäre Behandlung mit ABT-737,

eine Beobachtung welche in der vorliegenden Arbeit in 3.4.2 mutmaßend durch eine evtl. Induktion von MCL1 durch BCR-ABL erklärt werden konnte.

Aufgrund der spezifischen Wirkungsweise von ABT-737 gegenüber Proteinen der BCL2-Familie, können sich Resistenzen zügig entwickeln. Die zentrale Rolle der Resistenz scheint dennoch die Überexpression von MCL1 zu sein. Es wurde mittlerweile mehrfach für verschiedene maligne Zelllinien beschrieben, dass die Empfindlichkeit gegenüber ABT-737 invers mit dem MCL1-Expressionslevel korreliert.⁷²⁻⁷⁴ Letai et al. beschrieben, dass humane B-Zell-Lymphom-Zelllinien nach langfristiger Exposition mit ABT-737 durch anschließend signifikant höhere MCL1 Proteinlevel eine Resistenzentwicklung zeigten. Diese konnte nach Behandlung mit Flavopiridol, einer MCL1 downregulierenden Kinase, rückgängig gemacht werden.⁷⁵ Auf Grundlage dieser Beobachtungen wurden spezifische MCL1-Antagonisten wie kürzlich Maritoclax entwickelt, welche in ersten Studien synergistische Effekte zur BCL2-Inhibitorbehandlung zeigen.⁷⁶ Somit könnte eine Kombination von ABT-737 mit dem MCL1-Antagonisten Maritoclox in Zukunft eine Option zur Resistenzvermeidung sein.

5.4 Klinische Datenlage zu BCL2-Inhibitoren

Momentan sind folgende drei BCL2-Inhibitoren Gegenstand klinischer Studien mit publizierten Phase I/II Ergebnissen: GX15-070 (Obatoclax), AT-101 (Gossypol) sowie, das sich lediglich in der oralen Bioverfügbarkeit von dem in dieser Arbeit verwendeten ABT-737 unterscheidende ABT-263 (Navitoclax).

Gossypol zeigte lediglich moderate Erfolge in einer randomisierten Phase II Studie im Rahmen der Therapie des metastasierten Prostatakarzinoms.⁷⁷

Unter Obatoclax – in verschiedenen Studiendesigns in der Behandlung der CLL sowie des Hodgkin Lymphoms eingesetzt - kam es bei Phase I/II Studien zu vermehrt Nebenwirkungen aus dem neurologischen Formenkreis, weswegen diese Substanz eher hinter den Erwartungen blieb.^{78,79}

Navitoclax, das Analogon zu dem in dieser Arbeit verwendeten ABT-737, erzielte in einer klinischen Phase I Studie erfreuliche Ergebnisse. Bei 19 von 29 Patienten mit refraktärer CLL konnte unter Navitoclax Monotherapie ein partielles Ansprechen mit medianem progressionsfreiem Überleben von 25 Monaten beobachtet werden.⁸⁰

Interessanterweise konnte im Rahmen dieser Studie, die in dieser Arbeit

gemutmaßte inverse Korrelation von MCL1-Expression zu Ansprechen auf BCL2-Inhibition klinisch bewiesen werden.

Die genannten Inhibitoren unterscheiden sich in ihrer Spezifität bzgl. des Inhibitionspotentials der einzelnen Mitglieder der BCL2-Familie, so sind AT -101 und GX15-070 sog. Pan-Inhibitoren mit Effekt auf alle anti-apoptotischen Proteine, wo hingegen das ABT-737-Analogon Navitoclax eine selektive Affinität zu BCL2, BCL-xl und BCL-w aufweist. Möglicherweise liegt hierin eine Erklärung für das unterschiedliche Abschneiden in den aktuellen klinischen Studien sowie für das bei Navitoclax deutlich geringere Nebenwirkungspotential.

Insgesamt zeigt Navitoclax derzeit als zielgerichteter Inhibitor vielversprechende Ergebnisse, die Veröffentlichung mehrerer Phase II Studien zur Effizienz als Monotherapeutikum oder in Kombination werden erwartet.

5.5 Ausblick der zielgerichteten Therapie mit BCL2-Inhibitoren

Bislang zeigen klinische Studien hoffnungsvolle Ergebnisse für ABT-263 (Navitoclax) im Rahmen der Behandlung der CLL sowie evtl. für GX15-070 (Obatoclax) in Kombinationsregimen gegen das kleinzellige Bronchialkarzinom. Allerdings blieben auch mehrere Studien aufgrund mangelnder Effektivität hinter den Erwartungen, beispielsweise AT-101 (Gossypol) bei der Prostatakarzinombehandlung.

Um die Effektivität der Substanzen zu steigern richtet sich der derzeitige Fokus der Forschung auf die Optimierung der Dosierungsregime. Eine sequentielle Dosierung könnte im Umgang mit ABT-263 von Vorteil sein. Einerseits zeigt eine längerfristige Exposition mit ABT-263 eine schwere hämatologische Toxizität (Thrombozytenreduktion) als Nebenwirkung. Zum anderen spielt die in 5.3.1 beschriebene, durch Überexpression von MCL1 bedingte Resistenzentwicklung gegen ABT-263 eine wesentliche Rolle. Somit könnte zukünftig die Behandlung mit ABT-263 unter einem sequentiellen Dosierungsregime in Kombination mit dem selektiven MCL1-Inhibitor Maritoclax eine Resistenzentwicklung der Zellpopulationen verhindern, gleichzeitig jedoch genügend Zeit zur Thrombozytenregeneration bei den Patienten bieten.

Sog. Pan-BCL2-Inhibitoren könnten ein breites Spektrum an Nebenwirkungen mit sich bringen, da eine Vielzahl gesunder Zellen auf den Apoptoseschutz der BCL2-

Familie angewiesen ist. Somit wird die Zukunft eher in der Verwendung sehr spezifischer BCL2-Inhibitoren liegen. Allerdings kommt es hier leichter zu Resistenzentwicklungen wie für ABT-737 bzw. ABT-263 beschrieben (siehe 5.3.1).

Eine Weiterentwicklung bzw. das Generieren von Substanzen wie Maritoclax kann zukünftig diesem Problem entgegenwirken. Interessanterweise zeigen Experimente, dass verschiedene Tumorzellen beispielsweise des multiplen Myeloms oder der akuten myeloischen Leukämie in ihrem Wachstum von MCL1 abhängig sind.⁸¹

Da ABT-737 bzw. ABT-263 die Expressionslevel von MCL1 nicht beeinflussen sind diese Zelllinien resistent gegenüber ABT-737. Allerdings zeigten Fairlie et al., dass eine komplette Downregulation von MCL1 sowohl in der Zellkultur, als auch in vivo im Mausmodell zum Abtöten von Zellen der akuten myeloischen Leukämie führt.⁸² Eine Optimierung der Kombinationsregime bzw. das Generieren von MCL1-Inhibitoren mit möglicherweise höherer Affinität bzw. Spezifität wären in Zukunft sicher von klinischem Interesse.

Die Proteine der BCL2-Familie spielen eine entscheidende Rolle für das Überleben verschiedener maligner Zellen. Wie in dieser Arbeit verdeutlicht, sowie in anderen Studien bestätigt, können Inhibitoren dieser anti-apoptotischen Proteine maligne Zellen trotz zuvor bestehender Resistenzen zum Absterben bringen. BCL2-Inhibitoren zeigen Effektivität in der Apoptoseinduktion sowohl als alleiniges Agens, als auch in Kombinationstherapie. Dennoch sind die Verbesserung der Selektivität und der Bioverfügbarkeit, die Reduktion der Toxizität sowie der Resistenzentwicklungen eine zukünftige Herausforderung.

6 Literaturverzeichnis

-
- ¹ U.S. Government Statistics. Surveillance, epidemiology and end-results (SEER) of the National Cancer Institute; 2006.
- ² Appelbaum F, Rowe J, Radich J, Dick J. Acute myeloid leukemia. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program). 2001:62-68.
- ³ Tumorregister München, Überlebensstatistik akute myeloische Leukämie, Diagnosezeitraum 1988-2012.
- ⁴ Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA. The molecular basis of leukemia. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program) 2004:80-97.
- ⁵ Liersch R, Müller-Tidow C, Berdel WE, Krug U. Prognostic factors for acute myeloid leukaemia in adults--biological significance and clinical use. Br J Haematol. 2014; 165(1):17-38 .
- ⁶ Lowenberg B, Griffin JD, Tallman MS. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program) 2003:82-101.
- ⁷ Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. N Engl J Med. 2001; 344(14):1031-7.
- ⁸ Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R, Talpaz M. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. N Engl J Med. 2001; 344(14):1038-1042.
- ⁹ Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. Science. 2001; 293(5531):876-80.
- ¹⁰ Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM. Drug therapy for acute myeloid leukemia. Blood 2005; 106:1154-63.
- ¹¹ Small D, Levenstein M, Kim E, et al. STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91:459-63.
- ¹² Matthews W, Jordan CT, Gavin M, Jenkins NA, Copeland NG, Lemischka IR. A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88:9026-30.
- ¹³ Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. Annu Rev Biochem 2000; 69:373-98.
- ¹⁴ Rosnet O, Marchetto S, deLapeyriere O, Birnbaum D. Murine Flt3, a gene encoding a novel tyrosine kinase receptor of the PDGFR/CSF1R family. Oncogene 1991; 6:1641-50.
- ¹⁵ Lyman SD, Jacobsen SE. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. Blood 1998; 91:1101-34.
- ¹⁶ Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. Blood 2002; 100:1532-42.
- ¹⁷ Lisovsky M, Estrov Z, Zhang X, et al. Flt3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells: regulation of Bcl-2 and Bax. Blood 1996; 88:3987-97.

-
- ¹⁸ Schnittger S, Schoch C, Dugas M, Kern W, Staib P, Wuchter C, Löffler H, Sauerland CM, Serve H, Buchner T, Haferlach T, Hiddemann W. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 2002; 100: 59-66.
- ¹⁹ Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Jinnai I, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Oh H, Motoji T, Omoto E, Saito H, Ohno R, Ueda R. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 1999; 93: 3074-80.
- ²⁰ Kiyoi H, Towatari M, Yokota S, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia* 1998; 12:1333-7.
- ²¹ Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 2001; 97:2434-2439.
- ²² Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA, Care RS, Peake IR, Reilly JT. Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2001; 113:983-8.
- ²³ Schnittger S, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T. Rapid, Simple and Reliable Detection of FLT3 Asp835 Point Mutations in Acute Myeloid Leukemia and Identification of a New Length Mutation In Exon 20. *Blood (abstract)* 2001; 98:107a.
- ²⁴ Spiekermann K, Dirschinger RJ, Schwab R, et al. The tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits FLT3 and induces growth arrest and apoptosis in AML-derived cell lines expressing a constitutively activated FLT3. *Blood* 2003; 101:1494-1504.
- ²⁵ Mizuki M, Fenski R, Halfter H, et al. Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways. *Blood* 2000; 96:3907-3914.
- ²⁶ Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, et al. Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene* 2000; 19: 624-631.
- ²⁷ Tse KF, Mukherjee G, Small D. Constitutive activation of FLT3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation. *Leukemia* 2000; 14:1766-1776.
- ²⁸ Kelly LM, Liu Q, Kutk JL, Williams IR, Boulton CL, Gilliland DG. FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 2002; 99:310-318.
- ²⁹ Knapper S, Mills KI, Gilkes AF, Austin SJ, Walsh V, Burnett AK. The effects of lestaurtinib (CEP701) and PKC412 on primary AML blasts: the induction of cytotoxicity varies with dependence on FLT3 signaling in both FLT3 mutated and wild type cases. *Blood* 2006; 108(10):3494-503
- ³⁰ Bagrintseva K, Geisenhof S, Kern R, Eichenlaub S, Reindl C, Ellwart JW, Hiddemann W, Spiekermann K. FLT3-ITD-TKD dual mutants associated with AML confer resistance to FLT3 PTK inhibitors and cytotoxic agents by overexpression of Bcl-x(L). *Blood* 2005; 105(9):3679-85.
- ³¹ Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, Bruncko M, Deckwerth TL, Dinges J, Hadjuk PJ, Joseph MK, Kitada S, Korsmeyer SJ, Kunzer AR, Letai A, Li C, Mitten MJ, Nettesheim DG, Ng S, Nimmer PM, O'Connor JM, Oleksijew A, Petros AM, Reed JC, Shen W, Tahir SK, Thompson CB, Tomaselli KJ, Wang B, Wendt MD, Zhang H, Fesik SW, Rosenberg SH. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 2005; 435(7042):677-81.

- ³² Aichberger KJ, Mayerhofer M, Krauth MT, Skvara H, Florian S, Sonneck K, Akgul C, Derdak S, Pickl WF, Wacheck V, Selzer E, Monia BP, Moriggl R, Valent P, Sillaber C. Identification of mcl-1 as a BCR/ABL-dependent target in chronic myeloid leukemia (CML): evidence for cooperative antileukemic effects of imatinib and mcl-1 antisense oligonucleotides. *Blood* 2005; 105:3303-3311.
- ³³ Wang K, Gross A, Waksman G, Korsmeyer SJ. Mutagenesis of the BH3 domain of BAX identifies residues critical for dimerization and killing. *Mol Cell Biol.* 1998; 18:6083-6089.
- ³⁴ Wills SN, Chen L, Dewson G, Wie A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM, Huang DC. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL but not Bcl-2, until displaced by BH3-only-proteins. *Genes Dev.* 2005; 19:1294-1305.
- ³⁵ Kuroda J, Puthalakath H, Cragg MS, Kelly PN, Bouillet P, Huang DC et al. Bim and Bad mediate imatinib-induced killing of Bcr/Abl⁺ leukemic cells, and resistance due to their loss is overcome by a BH3 mimetic. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:14907-14912.
- ³⁶ Fiedler W, Serve H, Dohner H, Schwittay M, Ottmann OG, O'Farrell AM et al. A phase 1 study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for disease. *Blood* 2005; 105:986-993.
- ³⁷ O'Farrell AM, Foran JM, Fiedler W, Serve H, Paquette RL, Cooper MA et al. An innovative phase I clinical study demonstrates inhibition of FLT3 phosphorylation by SU11248 in acute myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res* 2003; 9:5465-5476.
- ³⁸ Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984; 22:27-55.
- ³⁹ Minami Y, Yamamoto T, Kiyoi H, Ueda R, Saito H, Naoe T. Different antiapoptotic pathways between wild-type and mutated FLT3: insights into therapeutic targets in leukemia. *Blood* 2003; 102:2969-2975.
- ⁴⁰ Jaiswal S, Traver D, Miyamoto T, Akashi K, Lagasse E, Weissman IL. Expression of BCR/ABL and BCL-2 in myeloid progenitors leads to myeloid leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:10002-10007.
- ⁴¹ Slack FJ, Weidhaas JB. MicroRNAs as a potential magic bullet in cancer. *Future Oncol* 2006; 2:73-82.
- ⁴² Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:259-269.
- ⁴³ Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev. Biol.* 2007; 303: 1-12.
- ⁴⁴ Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:13944-9.
- ⁴⁵ Illmer T, Kosel D, Schaich MA, Thiede C, Neubauer A, Mueller-Tidow C et al. MiRNA expression signatures in acute myeloid leukemia are predictors for patient outcome. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2006; 108:152.
- ⁴⁶ Klampfer L, Zhang J, Zelenetz AO, Uchida H, Nimer SD. The AML1/ETO fusion protein activates transcription of BCL-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 16:1383-90.
- ⁴⁷ Brumatti G, Weinlich R, Chehab CF, Yon M, Amarante-Mendes GP. Comparison of the anti-apoptotic effects of Bcr-Abl, Bcl-2 and Bcl-x(L) following diverse apoptogenic stimuli. *FEBS Lett.* 2003; 541:57-63.

-
- ⁴⁸ Amarante-Mendes GP, McGahon AJ, Nishioka WK, Afar DE, Witte ON, Green DR. Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-xL. *Oncogene* 1998; 16:1383-90.
- ⁴⁹ Xu ZW, Friess H, Buchler MW, Solioz M. Overexpression of Bax sensitizes human pancreatic cancer cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002; 49:504-510.
- ⁵⁰ Dai Y, Rahmani M, Corey SJ, Dent P, Grant S. A Bcr/Abl-independent, Lyn-dependent form of imatinib mesylate (STI-571) resistance is associated with altered expression of Bcl-2. *Biological Chemistry* 2004; 279:34227-43239.
- ⁵¹ Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116:205-219.
- ⁵² Molica S, Manella A, Dattio A, Levato D, Iuliano F, Peta A, Consarino C, Magro S. Differential expression of BCL-2 oncoprotein and Fas antigen on normal peripheral blood and leukemic bone marrow cells. A flow cytometric analysis. *Haematologica* 1996; 81:302-309.
- ⁵³ Hochhaus A, Kreil S, Corbin A, La Rosee P, Lahaye T, Berger U, Cross NC, Linkesch W, Druker BJ, Hehlmann R, Gambacorti-Passerini C, Corneo G, D'Incalci M. Roots of clinical resistance to STI-571 cancer therapy. *Science* 2001; 293: 2163.
- ⁵⁴ Stirewalt DL, Radich JP. 2003: The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 650-65.
- ⁵⁵ Wadleigh M, DeAngelo D, Griffin J, Stone R. After chronic myelogenous leukemia: tyrosine kinase inhibitors in other hematologic malignancies. *Blood* 2005; 105: 22-30.
- ⁵⁶ Knapper S et al., FLT3 inhibitor in acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology* 2007; 138:687-699.
- ⁵⁷ Zahng W, Konopleva M, Shi YX. Mutant FLT3: a direct target of Sorafenib in acute myelogenous leukemia. *JNCI* 2008; 100(3): 184-198.
- ⁵⁸ Takahashi K. FLT3 inhibitors are promising salvage therapy for relapsed or refractory acute myeloid leukemia (AML) in patients with FLT3-ITD mutations. *Blood* 2011; 118:3623 (ASH Annual Meeting Abstracts).
- ⁵⁹ Levis M, Allebach J, Tse KF, Small et al. A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo. *Blood* 2002; 99:3885-3891.
- ⁶⁰ Knapper S, Burnett A, Littelwood T, Kell J, Small D et al. A phase 2 trial of the FLT3 inhibitor lestaurtinib (CEP701) as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia not considered for intensive chemotherapy. *Blood* 2006; 108:3262-3270.
- ⁶¹ Levis M, Ravandi F, Wang E, Baer M, Perl A, Small D, Smith D et al. Results from a randomized trial of salvage chemotherapy followed by lestaurtinib for patients with FLT3 mutant AML in first relapse. *Blood* 2011; 3294-3301.
- ⁶² Knapper S, White P, Levis M, Hills R, Nigel R, Burnett A. The efficiency of the FLT3 inhibitor Lastaurtinib in AML depends on adequate plasma inhibitory activity, and is unaffected by rising FLT ligand levels: An update of the NCRI AML 15&17 trials. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2011; 118:421.
- ⁶³ Safaian NN, Czibere A, Bruns I et al. Sorafenib induces molecular remission and regression of extramedullary disease in a patient with FLT3-ITD(+) acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2009; 33:348-350.

-
- ⁶⁴ Metzelder SK, Wollmer E, Neubauer A, Burchert A. Sorafenib in relapsed and refractory FLT3-ITD positive acute myeloid leukemia: a novel treatment option. *Dtsch Med Wochenschr* 2010; 135: 1852-1856.
- ⁶⁵ Metzelder et al., ASH Annual Meeting Abstracts 2009; Abstract 2060.
- ⁶⁶ Zarrinkar P, Gunawardane R, Cramer M, Gardner M, Brigham D, Belli B, Levis M, Armstrong R, James J, Bhagwat S. AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2009; 2984-2992.
- ⁶⁷ Cortes J, Foran J, Ghirdaladze D et al. AC220, a potent, selective second generation FLT3 receptor tyrosine kinase (RTK) inhibitor, in a first-in-human (FIH) phase 1 AML study. *Blood* 2009;114: Abstract 636.
- ⁶⁸ Zeng Z, Shi XY, Samudio IJ et al. Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML. *Blood* 2009; 113:6215-6224.
- ⁶⁹ Metzelder SK, Schroeder T, Finck A, Burchert A et al. High activity of sorafenib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia synergizes with alloimmune effects to induce sustained responses. *Leukemia* 2012; 26(11):2353-9.
- ⁷⁰ Gandhi L, Camidge DR, Ribeiro de Oliveira M, Bonomi P, Gandara D, Khaira D, Hann CL, McKeegan EM, Litvinovich E, Hemken PM, Dive C, Enschede SH, Nolan C, Chiu YL, Busman T, Xiong H, Krivoshik AP, Humerickhouse R, Shapiro GI, Rudin CM. Phase I study of Navitoclax (ABT-263), a novel Bcl-2 family inhibitor, in patients with small-cell lung cancer and other solid tumors. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011; 29:909-16.
- ⁷¹ Tagscherer KE, Fassel A, Campos B, Farhadi M, Kraemer A, Böck BC, et al. Apoptosis-based treatment of glioblastomas with ABT-737, a novel small molecule inhibitor of Bcl-2 family proteins. *Oncogene*. 2008;27:6646–56.
- ⁷² Tahir SK, Wass J, Joseph MK, Devanarayan V, Hessler P, Zhang H, et al. Identification of expression signatures predictive of sensitivity to the Bcl-2 family member inhibitor ABT-263 in small cell lung carcinoma and leukemia/lymphoma cell lines. *Mol Cancer Ther*. 2010;9:545–57.
- ⁷³ Wesarg E, Hoffarth S, Wiewrodt R, Kröll M, Biesterfeld S, Huber C, et al. Targeting BCL-2 family proteins to overcome drug resistance in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2007;121:2387–94.
- ⁷⁴ Touzeau C, Dousset C, Bodet L, Gomez-Bougie P, Bonnaud S, Moreau A, et al. ABT-737 induces apoptosis in mantle cell lymphoma cells with a Bcl-2high/Mcl-1low profile and synergizes with other antineoplastic agents. *Clin Cancer Res*. 2011;17:5973–81.
- ⁷⁵ Yecies D, Carlson NE, Deng J, Letai A. Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that up-regulate MCL-1 and BFL-1. *Blood*. 2010;115:3304–13.
- ⁷⁶ Doi K, Li R, Sung SS, Wu H, Liu Y, Manieri W, et al. Discovery of marinopyrrole A (maritoclax) as a selective Mcl-1 antagonist that overcomes ABT-737 resistance by binding to and targeting Mcl-1 for proteasomal degradation. *J Biol Chem*. 2012;287:10224–35.
- ⁷⁷ Sonpavde G, Matveev V, Burke JM, Caton JR, Fleming MT, Hutson TE, Galsky MD, Berry WR, Karlov P, Holmlund JT, Wood BA, Brookes M, Leopold L. Randomized phase II trial of docetaxel plus prednisone in combination with placebo or AT-101, an oral small molecule Bcl-2 family antagonist, as first-line therapy for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2012.
- ⁷⁸ O'Brien SM, Claxton DF, Crump M, Faderl S, Kipps T, Keating MJ, et al. Phase I study of obatoclax mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009;113:299–305.

⁷⁹ Oki Y, Copeland A, Hagemeister F, Fayad LE, Fanale M, Romaguera J, et al. Experience with obatoclox mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist in patients with relapsed or refractory classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2012;119:2171–2.

⁸⁰ Roberts AW, Seymour JF, Brown JR, Wierda WG, Kipps TJ, Khaw SL, Carney DA, He SZ, Huang DC, Xiong H, Cui Y, Busman TA, McKeegan EM, Krivoshik AP, Enschede SH, Humerickhouse R. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2012; 30:488-96.

⁸¹ Glaser SP, Lee EF, Trunson E, Bouillet P, Wei A, Fairlie WD, et al. Anti-apoptotic Mcl-1 is essential for the development and sustained growth of acute myeloid leukemia. *Genes Dev*. 2012;26:120–5.